

Aus der Abteilung
für experimentelle Chirurgie und pathologische Biochemie
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lorenz

Histaminmethyltransferase im Magen des Meerschweinchens:
Vorkommen, Anreicherung, Eigenschaften
und Beeinflußbarkeit durch Magensaftstimulantien.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

WOLFGANG STENNER
aus Kirchhain

Marburg 1976

1977

Aus der Abteilung
für experimentelle Chirurgie und pathologische Biochemie
an der Chirurgischen Universitätsklinik Marburg
Vorstand: Prof. Dr. med. W. Lorenz

Histaminmethyltransferase im Magen des Meerschweinchens:
Vorkommen, Anreicherung, Eigenschaften
und Beeinflußbarkeit durch Magensaftstimulantien.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
WOLFGANG STENNER
aus Kirchhain

Marburg 1976

Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität Marburg am 28.1.1977
Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath
Referent: Prof. Dr. med. W. Lorenz
Correferent: Prof. Dr. med. H. Hamelmann

Für meine Eltern und Angelika





Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1
1.1. Bedeutung der Histaminmethyltransferase als Schlüsselenzym für die Wirkung von Histamin auf die Belegzelle	1
1.2. Vorkommen der Histaminmethyltransferase in Mägen verschiedener Säugetiere	4
1.3. Eigenschaften der Histaminmethyltransferase	4
1.4. Beeinflußbarkeit der Histaminmethyltransferase-Aktivität in vivo	8
1.5. Ziel der Arbeit	9
2. Material und Methodik	10
2.1. Material	10
2.1.1. Reagenzien	10
2.1.2. Enzympräparationen	10
2.1.2.1. Rohhomogenate	10
2.1.2.2. Teilreinigung der Histaminmethyltransferase aus Meerschweinchenmagen	11
2.1.3. Versuchstiere	12
2.1.4. Pharmaka zur Magensaftstimulierung	13
2.2. Methodik	14
2.2.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Histaminmethyltransferase	14
2.2.2. Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration	18
2.2.2.1. Biuret-Methode	18
2.2.2.2. Lowry-Methode	18
2.2.3. Fütterung der Meerschweinchen und Behandlung mit Magensaftstimulantien	19
2.2.4. Statistische Auswertung	19

3.	Ergebnisse	21
3.1.	Vorkommen und Verteilung der Histaminmethyltransferase in verschiedenen Meerschweinchenorganen	21
3.1.1.	Magen-Darm-Kanal und andere Organe bunter Meerschweinchen (Institutsstamm)	21
3.1.2.	Verschiedene Magenareale weißer und bunter Meerschweinchen (Institutsstämme)	24
3.1.3.	Magencorpus weitgehend pathogenfreier Meerschweinchen (Pirbright-Stamm)	26
3.2.	Anreicherung der Histaminmethyltransferase aus der Corpusschleimhaut des Meerschweinchenmagens	29
3.3.	Eigenschaften der Histaminmethyltransferase aus der Corpusschleimhaut des Meerschweinchenmagens	29
3.3.1.	Michaelis-Konstanten für Histamin	29
3.3.2.	pH-Optima	33
3.4.	In-vitro-Beeinflussung der Histaminmethyltransferase-Aktivität aus der Corpusschleimhaut des Meerschweinchenmagens durch Magensaftstimulantien	35
3.5.	Veränderungen der Histaminmethyltransferase-Aktivität in der Corpusschleimhaut des Meerschweinchenmagens nach Stimulation der Magensaftsekretion	38
3.5.1.	Stimulation durch Fütterung	38
3.5.2.	Stimulation durch Pentagastrin und Caerulein	40
3.5.3.	Stimulation über cholinerge Mechanismen	44
4.	Diskussion	46
4.1.	Stellung der Histaminmethyltransferase im Histaminstoffwechsel der Magenschleimhaut	46
4.2.	Reinigung der Histaminmethyltransferase aus Meerschweinchenorgangewebe	47

4.3.	Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der Histaminmethyltransferase aus Meerschweinchencorpusgewebe mit den Ergebnissen über die Histaminmethyltransferase aus anderen Organen	49
4.4.	Bedeutung der Steigerung der HMT-Aktivität durch Magensaftstimulation	51
5.	Zusammenfassung	54
6.	Literaturverzeichnis	56

In dieser Arbeit wurden folgende häufig wiederkehrende und gebräuchliche Abkürzungen benutzt:

- HMT Histaminmethyltransferase
(S-Adenosyl-methionin: Histamin-N-Methyltransferase;
E C 2.1.1.8)
- SAM S-Adenosyl-L-methionin
- SAH S-Adenosyl-L-homocystein
- NaPP Natriumdihydrogenphosphat/Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer

1. Einleitung

1.1. Bedeutung der Histaminmethyltransferase als Schlüssel- enzym für die Wirkung von Histamin auf die Belegzelle

Für die Verbindung zwischen hormonalen Wirkungen an Drüsenzellen und dem eigentlichen Sekretionsprozeß ("stimulus secretion coupling") werden verschiedene Konzepte auf molekularbiologischer Ebene diskutiert. Erwiesen ist eine Übertragung dieser Effekte durch cyclisches Adenosinmonophosphat, durch Calciumionen, oder an neuronalen Synapsen über die parasymphatische Nervenregung durch Acetylcholin bzw. über Sympathicusstimulierung durch Catecholamine (Noradrenalin, Adrenalin und Dopamin). Über derartige Funktionen von Prostaglandinen, Peptiden und biogenen Aminen wie Serotonin und Histamin gibt es bis heute noch keine gesicherten Erkenntnisse, sondern allenfalls Hypothesen.

Die Stimulation der Magensaftsekretion durch Histamin wurde erstmals 1920 nachgewiesen (POPIELSKI, 1920). Seit-her wurde von zahlreichen Autoren (zur Übersicht s. LORENZ & PFLEGER, 1968) die Hypothese von Histamin als dem finalen Chemostimulator der Magensaftsekretion favorisiert, gleichsam als Bindeglied zwischen vagaler Acetylcholin-, bzw. antraler und intestinaler Gastrin-freisetzung und Auslösung der Salzsäuresekretion des Magens (s. Tab. 1). Hierzu kamen in den letzten Jahren Hypothesen über eine physiologische Rolle von Histamin bei der Magensaftsekretion, in welchen diesem biogenen Amin die unterschiedlichsten Beeinflussungen verschiedener Kontroll-, Überträger- und Potenzierungsmechanismen zugeschrieben werden (s. Tab. 1).

Die These des finalen Chemostimulators wurde indessen in Arbeiten verschiedener Autoren weitgehend abgelehnt (GROSSMAN, 1967; AURES et al. 1969; JOHNSON & GROSSMAN, 1969; HÅKANSON & LIEBERG, 1971; WATON, 1971).

Dem Histamin zugeordnete Funktion bei der
Magensaftsekretion

1. Gemeinsamer finaler Chemostimulator der Magensaftsekretion (CODE, 1956; LORENZ & PFLEGER, 1968)
2. Regulator metabolischer Prozesse in der Magenschleimhaut (JOHNSON, 1971)
3. Generelle Funktion in endokrinen, Polypeptide sezernierenden Zellen (HÅKANSON, 1970)
4. Kontrolle der Mikrozirkulation um die Parietalzelle (WATON, 1971)
5. Mediator der durch Gastrin stimulierten Magensaftsekretion (BLACK, 1973)
6. Potenzierung der durch Gastrin stimulierten Magensaftsekretion (TROIDL et al. 1973)
7. Effektor am Gastrin- und Acetylcholin-Rezeptor über den Histamin- H_2 -Rezeptor (GROSSMAN & KONTUREK, 1973)
8. Mediator und /oder Potentiator der Gastrinfreisetzung im Antrum (LORENZ et al. 1970; FIELDING et al. 1974)

Tab. 1 Übersicht über die vorgeschlagenen Hypothesen einer möglichen physiologischen Funktion des Histamins in der Magenschleimhaut

In den letzten Jahren stützte aber die Entdeckung der Histamin- H_2 -Rezeptorantagonisten Burimamid, Metiamid und Cimetidin (BLACK et al. 1972; BLACK et al. 1973; BRIMBLECOMBE et al. 1975) wiederum diese These, da die spezifischen H_2 -Rezeptorantagonisten sowohl die durch Histamin und Gastrin als auch die durch Acetylcholin induzierte Magensaftsekretion hemmen konnten.

Die vielen widersprüchlichen Hypothesen zu diesem Fragenkomplex legten aber nahe, daß die Theorie von Histamin als dem finalen Chemostimulator der Magensaftsekretion die vielfältigen Reaktionen verschiedener Hormone und Nerven an den salzsäurebildenden Belegzellen zu einfach darstellte. Die Beobachtung, daß sich fast alle gastro-intestinalen Hormone in ihrer Wirkung auf die Magensaftsekretion gegenseitig beeinflussen (AMURE & GINSBURG, 1964, 1964 a; DINBAR & GROSSMAN, 1972; GREGORY, 1958; JOHNSON & GROSSMAN, 1969; COOKE, 1970; KONTUREK & OLESKY, 1967) und daß diese Wechselwirkung verschiedener Hormone und Transmitter stark von der Konzentration des einzelnen Stoffes in Rezeptornähe abhängt, machte die Wichtigkeit der Kontrolle dieser Vorgänge durch enzymatische Aktivitäten und Speicherungs- sowie Freisetzungsmechanismen deutlich. Das Enzym, das sehr wahrscheinlich in entscheidender Weise die lokale Konzentration des Histamins reguliert, ist die spezifisch Histamin umsetzende Histamin-methyltransferase (HMT), die - ähnlich wie die Acetylcholinesterase die freie Acetylcholinmenge - die Histaminmenge kontrolliert. Diese Hypothese ergibt sich vor allem aus dem Befund, daß im Magen praktisch keine oxydative Desaminierung des Histamins vorkommt (LORENZ et al. 1968; KUSCHE et al. 1969; LORENZ et al. 1975), welche bis heute den zweiten entscheidenden Stoffwechselweg der Histamininaktivierung darstellt (SCHAYER, 1959); Die HMT der Magenschleimhaut des Meerschweinchens wurde deshalb im folgenden untersucht.

1.2. Vorkommen der Histaminmethyltransferase in

Mägen verschiedener Säugetiere

In den Mägen folgender Säugetiere konnte bisher Histaminmethyltransferase-Aktivität nachgewiesen werden: Mensch (LORENZ et al. 1970; 1970 a; BARTH et al. 1972; 1975; 1976; DENCKER et al. 1973); menschlicher Fötus (LINDBERG et al. 1963); Hund (KIM et al. 1969; LORENZ et al. 1970; 1970 a; BARTH et al. 1975); Rind (LORENZ et al. 1970; 1970 a); Schwein (LORENZ et al. 1970; 1970 a; BARTH et al. 1972; BARTH et al. 1974; Katze (BROWN et al. 1959; BUNCE & LAKE, 1975); Kaninchen (BROWN et al. 1959; KIM et al. 1969; BARTH et al. 1974; 1975 a); Meerschweinchen (BROWN et al. 1959; KIM et al. 1969; AXELROD & VESELL, 1970; TAYLOR, 1973; MASLINSKI et al. 1976; FEMPEL et al. 1976; BERGMARK et al. 1976) und Maus (BROWN et al. 1959; KIM et al. 1969). Die bisher einzig bekannte Spezies, bei der im Magen keine Histaminmethyltransferase-Aktivität gefunden werden konnte, ist die Ratte (BROWN et al. 1959; KIM et al. 1969; AXELROD & VESELL, 1970; BARTH, 1976 persönl. Mitteilung). Eine Charakterisierung oder Reinigung des Enzyms aus Magenschleimhautgewebe wurde bisher nur aus dem des Schweines vorgenommen. (BARTH et al. 1972; BARTH, 1974; LORENZ et al. 1972).

1.3. Eigenschaften der Histaminmethyltransferase

Die HMT setzt S-Adenosyl-L-methionin (SAM) und Histamin (4-(β -Aminoäthyl)-imidazol) zu S-Adenosyl-L-homocystein (SAH) und N^ε-Methylhistamin (1-Methyl-4-(β -Aminoäthyl)-imidazol) um (Abb. 1). Allgemein werden bei Transmethylierungsreaktionen die Methylgruppen als Einheit übertragen (DU VIGNEAUD et al. 1956). Der Transfer erfolgt in Form einer nucleophilen Substitution am Akzeptor-substrat (SHAPIRO & SCHLENK, 1960; MUDD & CANTONI, 1964; O'LEARY, 1965).

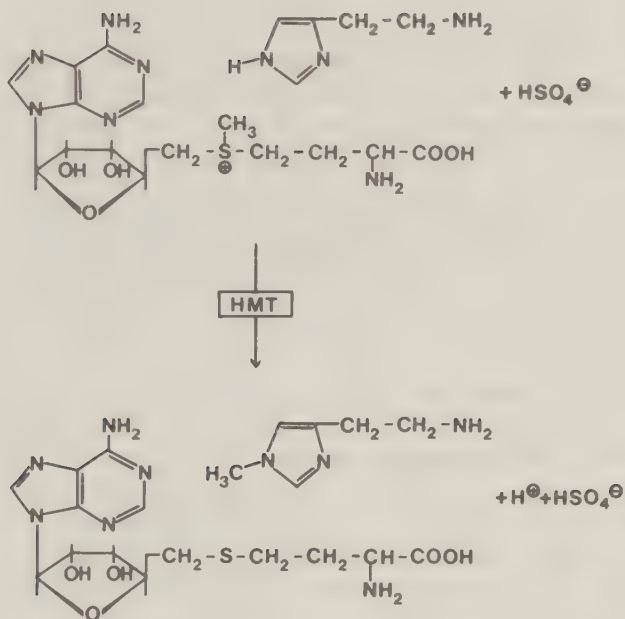


Abb. 1 Reaktionsschema der durch HMT katalysierten Transmethylierung

Der stark exergone Übergang von SAM zu SAH macht es wahrscheinlich, daß Transmethylierungsreaktionen irreversibel verlaufen (SCHLENK, 1965). Die Reaktion läuft nach dem geordneten Bi-Bi-Sequenzmechanismus ab (BARTH, 1974; BARTH et al. 1975 b).

Die HMT benötigt als Donorsubstrat für die Methylierung des Histamins die aktivierte Methylgruppe des SAM (BARTH, 1974; BARTH et al. 1974 a). Die Akzeptorsubstratspezifität der HMT wurde bei den Enzymen aus Meerschweinchenhirn (BROWN et al. 1959; THITHAPANDHA, 1972), Schweineleber (LINDAHL, 1960; GUSTAFSSON & FORSHELL, 1964) Katzendarm (THITHAPANDHA, 1972) und Schweineantrum mucosa (BARTH et al. 1973; 1975 b) geprüft. Von allen untersuchten Verbindungen (Imidazole, Pyrazole, Triazole, Thiazole, Pyrazine, Pyridazine, Pyridine etc.) wurden nur Histamin, im Falle des Enzyms aus Schweineleber nur Histamin und N',N'-Dimethylhistamin (4-(β -Dimethylaminoäthyl)-imidazol (GUSTAFSSON & FORSHELL, 1964), und durch das Enzym aus Schweineantrum mucosa nur Histamin und N'-Methylhistamin (4-(β -Methylaminoäthyl)-imidazol) (BARTH et al. 1973; 1975 b) methyliert. N'-Methylhistamin und N',N'-Dimethylhistamin waren aber schlechtere Substrate als Histamin, wobei die Methylierungsgeschwindigkeiten nur etwa 15 bzw. 30% von der des Histamins unter denselben Inkubationsbedingungen (optimal für Histamin) betrugen.

Bisher bekannte K_m -Werte für die HMT bezüglich Histamin und SAM als Substrate und die pH-Optima sind in Tab. 2 zusammengestellt. Aus der Leber des Hundes und des Menschen konnten AXELROD & VESELL (1970) durch Stärkegelelektrophorese zwei Enzymfraktionen trennen, die verschiedene Michaeliskonstanten zeigten.

Bis heute ist nicht bekannt, ob die HMT für ihre volle Aktivität einen Cofaktor benötigt. So steigern z.B. 2-wertige Metalle wie Magnesium, das ein Cofaktor der Catechol-O-methyltransferase (EC 2.1.1.6) ist (AXELROD & TOMCHICK, 1958), die Umsatzgeschwindigkeit von Histamin

Spezies	Organ	K_m (Histamin) $\times 10^{-5}M$	K_m (SAM) $\times 10^{-5}M$	pH-Optimum	Literatur
Meer- schwein-	Hirn	3,5 4,3 4,1 3,7 0,8	38 0,97 2,1 0,24 0,6	7,2-7,4 - 8,4 - -	BROWN et al. 1959 THITHAPANDHA & COHN, 1970 THITHAPANDHA, 1972 SURIYACHAN & THITHAPANDHA, 1972 BAUDRY et al.
Maus	Hirn	0,6-0,9	3,0	-	TAYLOR & SNYDER, 1972
Ratte	Niere	2,33	-	-	NETTER & BODENSCHATZ, 1967
Kaninchen	Darm	1,2	0,87	8,8	SURIYACHAN & THITHAPANDHA, 1972
Katze	Leber	8,1	-	-	AXELROD & VESELL, 1970
	Niere	3,8 2,6	1,2 1,3	- 8,2	THITHAPANDHA & SRINOOT, 1972 SURIYACHAN & THITHAPANDHA, 1972
	Darm	3,6 2,7	2,6 1,1	8,0-8,2 -	THITHAPANDHA, 1972 SURIYACHAN & THITHAPANDHA, 1972
Hund	Leber	1,0 u. 2,4	-	-	AXELROD & VESELL, 1970
Schwein	Magen	1,71 ⁺	0,87	7,4	BARTH et al. 1975 b
	Leber	10,0 2,2	- 1,6	7,0-10,0 8,8	LINDAHL, 1960 GUSTAFSSON & FORSHELL, 1964
Mensch	Leber Monozyten	95 u. 2,0 0,4	- 2,0	- -	AXELROD & VESELL, 1970 ZEIGER et al. 1976

Tab. 2 Zusammenstellung von bisher bekannten K_m -Werten und pH-Optima von HMT
aus verschiedenen Geweben

⁺ K_m für N⁶-Methylhistamin $6,6 \times 10^{-5}M$ (BARTH et al. 1975 b)

nicht (BROWN et al. 1959; GUSTAFSSON & FORSHELL, 1964; BARTH, 1974).

1.4. Beeinflußbarkeit der Histaminmethyltransferase-

Aktivität in vivo

Wegen der Bedeutung der HMT für den Histaminstoffwechsel wurde intensiv einerseits nach geeigneten, möglichst wirksamen und wenig toxischen Inhibitoren gesucht, andererseits sollte eine Beeinflussung der Aktivität durch Gabe von Pharmaka, Erhöhung oder Erniedrigung von Hormonen- bzw. Chemotransmitterspiegeln oder Erzeugung bestimmter pathophysiologischer Zustände möglich sein.

Als in vivo Hemmstoffe der HMT wurden bisher nur N^τ-Methylhistamin (SCHAYER & REILLY, 1970; 1973; 1974; REILLY & SCHAYER, 1970; 1971; 1971 a; SCHWARTZ et al. 1971), Amodiachin (COHN, 1966; SCHAYER & REILLY, 1973; BARTH et al. 1975), Chlorochin (SPANDAU, 1976), Cu²⁺-Ionen (WHITE, 1961), der H₁-Rezeptorantagonist Chlorpromazin (WHITE, 1961; WHITE, 1966; SCHWARTZ et al. 1971; REILLY & SCHAYER, 1971) sowie die H₂-Rezeptorantagonisten Burimamid (MORONI et al. 1973;) und Metiamid (SHEPHERD et al. 1974; THJODLEIFSSON & WORMSLEY, 1975) untersucht. Die Enzymhemmung wurde entweder mittels der Abnahme N^τ-Methylhistamingehalts in den Geweben bzw. Perfusionsflüssigkeiten oder durch Zunahme der Histaminausscheidung im Harn bestimmt. Mit Ausnahme von Chlorpromazin und Metiamid verminderten die genannten Stoffe die Methylierung des Histamins in vivo.

Eine Steigerung der Enzymaktivität im Sinne einer erhöhten Bereitstellung von aktivem Enzymprotein oder von Proteinneubildung konnte bisher nur in zwei Fällen beobachtet werden: (1) Beim Kaninchen steigt nach 1- bis 10- wöchiger Unterbindung der Ureteren als Folge eines stark erhöhten Histaminspiegels die HMT-Aktivität des

Nierengewebes in einem adaptiven Verlauf auf das 3-5 fache an, wobei dieser Anstieg sowohl durch Cycloheximid als auch durch Puromycin hemmbar war (BARTH et al. 1974; 1975 a;) (2) Die Magenschleimhaut von Ulcus-duodeni-Patienten zeigte nach selektiver proximaler Vagotomie mit Pyloroplastik eine signifikant erhöhte HMT-Aktivität, die wiederum mit einem erhöhten Histamingehalt einherging (BARTH et al. 1976).

1.5. Ziel der Arbeit

Da die Erhöhung der HMT-Aktivität in der Corpusmucosa vagotomierter Ulcus duodeni Patienten bisher der einzige Hinweis auf die Möglichkeit einer Stimulierbarkeit eines histaminabbauenden Enzyms in der Magenschleimhaut war, sollte in dieser Arbeit der Einfluß von magensaft-stimulierenden Hormonen und Pharmaka auf die HMT der Magenschleimhaut des Meerschweinchens untersucht werden. Dabei waren folgende Schritte nötig:

1. Qualitativer und quantitativer Nachweis von HMT-Aktivität in der Magenschleimhaut des Meerschweinchens.
2. Anreicherung des Enzyms aus diesem Gewebe und Ermittlung der enzymatischen Eigenschaften des Roh- und des teilgereinigten Enzyms.
3. Bestimmung der HMT-Aktivität in der Magenschleimhaut des Meerschweinchens nach Stimulation der Magensaftsekretion durch Fütterung, Pentagastrin, Caerulein, Carbachol, Insulin und 2-Desoxy-D-Glukose.

2. Material und Methodik

2.1. Material

2.1.1. Reagenzien

Zur Zubereitung sämtlicher Lösungen und Puffergemische wurde ausschließlich bidestilliertes Wasser (Bidestillationsanlage, 2. Stufe Quarzglas, Typ 1108 Köttermann, Hänsingen) verwendet.

zu den Inkubationsansätzen:

Histamin-Dihydrochlorid puriss. (Fluka, Buchs), S-Adenosyl-L-Methionin-Hydrogensulfat (Boehringer, Mannheim), S-Adenosyl-L-(methyl- ^{14}C)-Methionin (0,51 mCi/mmol, The Radiochemical Centre, Amersham), ^{14}C -Toluol-Standard (Buchler, Braunschweig), 2,2'-p-Phenylen-bis-(5-phenyl-oxazol) (POPOP), 2,5-Diphenyloxazol (PPO), Toluol (alle "für Szintillationsmessungen"), Äthanol ("Uvasol (R)"), Isoamylalkohol p.a., alle anorganischen Salze, Säuren und Basen (alle Merck, Darmstadt).

zur Proteinbestimmung:

Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz (Merck, Darmstadt), Albumin aus Rinderserum, reinst (Serva, Heidelberg).

Ionenaustauscher:

DEAE-Cellex-SS p.a. 50-200 μ (Serva, Heidelberg).

Pharmaka:

Pentagastrin-Reinsubstanz, Carbamylcholinchlorid-Reinsubstanz (Merck, Darmstadt); Caerulein und Insulin s. 2.1.4.

2.1.2. Enzympräparationen

2.1.2.1. Rohhomogenate

Zur Bestimmung der HMT-Aktivität in verschiedenen Meerschweinchenorganen und in der Magenwand nach Stimulationsversuchen mit verschiedenen Magensaft-

stimulationen (s. 3.5.) genügte eine relativ einfache Enzympräparation. Dazu wurden die zu untersuchenden Gewebe innerhalb von 15 min nach Tötung der Tiere (Genickschlag) entnommen. Die Mägen wurden zusätzlich nach der Entnahme entlang der großen Kurvatur eröffnet, mit eiskalter Tyrode-Lösung abgespült und in drei Teile entsprechend Fundus, Corpus, Antrum geteilt. Die Grenze zwischen Fundus und Corpus des Meerschweinchenmagens ist äußerlich durch die hellere Farbe des Fundusgebietes, die Grenze zwischen Corpus und Antrum durch die prominente Muskelschicht des Antrums erkennbar. Die Organe wurden dann bei -20°C aufbewahrt und nach 3-14 Tagen aufgearbeitet. Zur Herstellung der Enzymlösung wurden die Gewebeteile gewogen, mit der doppelten Gewichtsmenge 0,05 M NaPP, pH 7,4, versetzt und mit einem Ultraturrax (Typ 18/2N, Jahnke und Kunkel, Stauffen) homogenisiert. Das Homogenat wurde danach zuerst 20 min bei einer mittleren Beschleunigung von 60 000 g (Scrvall RC2B, Hormuth & Vetter, Wiesloch) und dann 45 min bei einer solchen von 143 000 g (Spinco L2 75 B, Beckmann, München) zentrifugiert. Sämtliche Arbeitsschritte wurden bei $0-2^{\circ}\text{C}$ durchgeführt.

2.1.2.2. Teilreinigung der Histaminmethyltransferase aus Meerschweinchenmagen

Die spezifische Aktivität der HMT ist in der Magenschleimhaut der verschiedenen Spezies 5-10fach höher als im Meerschweinchenhirn, dem Organ, aus dem die erste Anreicherung des Enzyms versucht wurde (BROWN et al. 1959). Diese hohe Ausgangsaktivität und die Frage nach der Identität des nach Magensaftstimulation untersuchten Enzyms über mehrere Reinigungsstufen waren die Gründe für eine weitergehende Anreicherung des Enzyms aus Magengewebe.

1. Schritt: Homogenisation und Ultrazentrifugation:

Aus den Mägen von 20 Meerschweinchen wurden 35,9 g Corpusgewebe gewonnen. Diese wurden nach Zugabe von 2 Volumina eiskaltem 0,01 M NaPP, pH 7,4, mit einem Ultraturrax homogenisiert. Eine 20 min Zentrifugation des Homogenates bei 60 000 g und eine nachfolgende von 143 000 g ergaben 65 ml Überstand.

2. Schritt: Anreicherung an DEAE - Cellulose:

Dieser Überstand wurde 1:2(v/v) mit 65 ml 0,1 M NaPP, pH 7,4, verdünnt und auf eine Säule von DEAE-Cellulose (2,5 cm Ø, 17,5 cm lang, äquilibriert mit 0,01 M NaPP, pH 7,4) aufgebracht. Die Säule wurde mit 290 ml 0,01 M NaPP, pH 7,4, gewaschen. Nicht adsorbiertes Protein und die Waschflüssigkeit wurden auf Enzymaktivität untersucht. Die Elution des Enzyms erfolgte durch einen kontinuierlichen, konvexen Kochsalzgradienten. In die Mischkammer von 120 ml, die zu Beginn der Elution 0,01 M NaPP, pH 7,4, enthielt, lief aus einem Vorratsgefäß derselbe NaPP, der Kochsalz in 2 M Konzentration enthielt, zu. Die Elutionsrate betrug 24 ml/h. Das Erscheinen der Proteine im Eluat wurde mit einem UV-Absorptionsspektrometer bei 280 nm (Uvicord II, LKB, Bromma), die Änderung der Leitfähigkeit mit Hilfe eines Konduktometers (LF 39, WTW, Weilheim) verfolgt. Das Eluat wurde in 7,5 ml Portionen gesammelt (Ultrovac, LKB, Bromma) und dem Enzymtest zugeführt. Die Fraktionen des 3. Elutionsgipfels enthielten die höchste HMT-Aktivität und wurden ohne Entsalzen eingefroren.

2.1.3. Versuchstiere

Die Vorserienversuche und die HMT-Aktivitätsbestimmungen verschiedener Organe wurden an weißen und bunten Meerschweinchen beiderlei Geschlechts eines

Institutsstamms durchgeführt. Da für die zu erwartenden relativ geringen Änderungen der HMT-Aktivität in den Mägen nach Stimulation der Magensaftsekretion die mit diesem Tierstamm zu erhaltenden Werte zu stark streuten (vgl. 3.1.2.), wurden die folgenden Versuchsserien an einem Meerschweinchenstamm des Virus Research Institute, Pirbright, Surrey, Großbritannien, durchgeführt (Bezug über die Behring Werke, Marburg). Die Hauptversuchsserien 1 - 6 wurden mit Tieren beiderlei Geschlechts, die Serien 7 - 10 nur mit Tieren männlichen Geschlechts durchgeführt. Alle Tiere hatten ein Gewicht von 250 - 330 g.

2.1.4. Pharmaka zur Magensaftstimulierung

Pentagastrin (Gastrodiagnost (R), 0,5 mg/2 ml; Merck, Darmstadt); Caerulein (Caeruleina Viscerocinetico, 20 µg/ml; Farmitalia, Mailand); Carbachol (Doryl (R), 0,25 mg/ml; Merck, Darmstadt); Histamin-Dihydrochlorid puriss. (Herstellung von Injektionslösungen in physiologischer Kochsalzlösung; 40 µg/ml-120 µg/ml; Fluka, Buchs); 2-Desoxy-D-Glukose puriss. (Herstellung von Injektionslösungen in physiologischer Kochsalzlösung, 25 mg/ml-250 mg/ml; Fluka, Buchs); Altinsulin vom Rind, kristallin (Insulin "Hoechst" (R), 400 IU/ml; Farbwerke Hoechst, Frankfurt).

2.2. Methodik

2.2.1. Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Histaminmethyltransferase

Prinzip der Methode

Die Aktivität des histaminabbauenden Enzyms HMT wurde mittels einer Isotopenmethode (BARTH et al. 1973; 1973 a;) bestimmt, welche eine Modifikation der Methode von SNYDER & AXELROD (1965) darstellt. Dabei wird die entstehende Menge des Reaktionsprodukts N^τ-Methylhistamin gemessen.

Zusammensetzung der Inkubationsgemische

Zur Enzymaktivitätsbestimmung waren in einem Ansatz von 0,5 ml Gesamtvolumen die in Tab. 3 angegebenen Substanzen enthalten.

Für Fragestellungen wie Bestimmung von Michaelis-konstanten, pH-Optimum und Hemmstoffwirkungen wurden dagegen die in Tab. 4 angegebenen Konzentrationen der einzelnen Reaktionspartner gewählt.

Durchführung der Inkubationen

Die Reaktion wurde durch Zugabe von SAM gestartet, nachdem die übrigen Reaktionsteilnehmer bereits 30 min in Reagenzgläsern mit Glasschliff unter Luftatmosphäre in einem Thermoblock (CH 12 Liebisch, Brackwede) bei 37°C vorinkubiert worden waren. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,5 ml 0,5 M Boratpuffer, pH 10,0, gestoppt. Zur HMT-Aktivitätsbestimmung eines einzelnen Gewebes wurden jeweils ein abgestoppter Blankwert (vorinkubiert mit 0,5 ml 0,5 M Boratpuffer, pH 10,0) und drei Hauptwerte, entsprechend den Inkubationszeiten 10, 20 und 30 Minuten, bestimmt. Weitere Blankwerte wurden durch Inkubation mit hitzeinaktiviertem Enzym (10 min bei 100°C) erhalten. Durch diese Inkubationen wurde diejenige Radioaktivität ermittelt, die nicht von dem enzymatisch gebildeten ¹⁴C-N^τ-Methylhistamin, sondern

Komponenten des Reaktions- gemisches	Volumen [μ l]	Konzen- tration [mM]	Endkonz. [mM]	Menge/Ansatz [μ mol]
NaPP, pH 7,4	200	50	45	22,5
Enzymlösung	100	—	—	—
Histamin	100	0,584	0,117	0,058
SAM ¹⁾	50	5	0,7	0,35
¹⁴ C-SAM ²⁾³⁾	50	2		

Tab. 3 Mengen-, Volumen- und Konzentrationsangaben
der einzelnen Komponenten des Inkubationsge-
misches für die Bestimmung der HMT-Aktivität
mittels des Isotopen-Enzymtestes

Enzymprotein, Histamin und nicht radioaktives SAM waren in 0,05 M NaPP, pH 7,4, gelöst.

- 1) Die Einwaage muß mit dem Faktor 1,724 multipliziert werden, da nach Angaben des Herstellers nur 58 % der Substanz reines SAM sind.
- 2) Gelöst in Schwefelsäure, pH 2,0-3,0.
- 3) Spezifische Aktivität 0,51 mCi/mmol $\hat{=}$ 51 nCi/Ansatz $\hat{=}$ 113 220 dpm/Ansatz.

Bestimmung von	Histamin [μM]	SAM [μM]	Hemmstoff ⁺ 100 μl , [μM]	NaPP [μl]
K_m (Histamin)	5-800	700	—	200
pH-Optimum	117	700	—	200
Hemmstoffwirkung	117	700	0,03-1000	100

Tab. 4 Modifizierte Inkubationsbedingungen (nur Endkonzentrationen für die Bestimmung von Michaelis-konstanten, pH-Optimum und Hemmstoffwirkungen)

⁺ gelöst in 0,05 M NaPP, pH 7,4.

von Verunreinigungen oder Hydrolyseprodukten stammte. Sie stimmte mit der Aktivität der 0-Werte überein und stieg von 80 cpm für die Zeit 0 min auf 150 cpm für die Inkubation von 60 min an.

Extraktion von N^τ-Methylhistamin aus dem Inkubationsgemisch und Messung von ¹⁴C-N^τ-Methylhistamin

Nach der Inkubation wurden 6 ml eines Toluol-Isoamylalkohol-Gemisches (3:2 v/v) in die Reagenzgläser gegeben und auf einem Horizontalschüttler (Bühler, Tübingen) das gebildete N^τ-Methylhistamin in die organische Phase ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde dann durch 5 min Zentrifugation bei 1800 g abgetrennt. Die Ausbeute dieser Extraktion wurde durch die Zugabe von ¹⁴C-N^τ-Methylhistamin als internem Standard bestimmt. (Dieses Standard-¹⁴C-N^τ-Methylhistamin wurde im Labor durch enzymatische Bildung unter Verwendung von HMT aus Schweinemagen und anschließender Dünnschichtchromatographie auf Celluloseplatten hergestellt (BARTH, 1974)).

Zur Messung wurden 4 ml der organischen Phase in Polyäthylen-Szintillationsfläschchen zusammen mit 10 ml Toluol-Szintillator (0,4% PPO und 0,01% POPOP) und 2ml absolutem Äthanol gefüllt und im Flüssigkeitsszintillationszähler (TriCarb 3380, Packard, Frankfurt) auf $\pm 1,5\%$ (2σ-Grenze) genau gezählt. Ein gerätebedingter Background von 30 cpm wurde durch automatische Subtraktion am Szintillationszähler berücksichtigt.

Ermittlung der HMT-Aktivität

Zur Ermittlung der HMT-Aktivität wurde von den Inkubationswerten zu den Zeiten 10, 20, 30 min der Nullwert abgezogen und die Reaktionsgeschwindigkeit in cpm/min ermittelt. Das arithmetische Mittel der zu verschiedenen Zeitpunkten gemessenen Geschwindigkeit ergab dann die lineare Anfangsgeschwindigkeit der Reaktion, aus der dann unter Einbeziehung des entsprechenden Proteingehalts im Inkubationsgemisch die spezifische Aktivität der HMT als pmol gebildetes N^τ-Methylhistamin/(min x mg Protein) bestimmt wurde.

2.2.2. Methoden zur Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Aktivität der HMT wurde immer auf die eingesetzte Proteinmenge bezogen. Die Proteinkonzentration von Rohhomogenaten wurde mit der Biuret-Methode (WEICHELBAUM, 1946), die von angereichertem Enzympräparationen nach der Lowry-Methode (LOWRY et al. 1951) bestimmt.

2.2.2.1. Biuret-Methode

0,1 ml der Enzymlösung wurden mit 5,0 ml Biuret-Reagenz und 5,0 ml physiologischer Kochsalzlösung versetzt und am Eppendorf-Photometer bei 546 nm gegen einen Leerwert ohne Proteinlösung gemessen. Als Referenzwert diente Albumin aus Rinderserum. Der nach der Formel $E \times f = \text{mg Protein/ml}$ ermittelte Proportionalitätsfaktor wurde bei Verwendung von 0,1 ml Enzymlösung mit $f = 418$ bestimmt.

2.2.2.2. Lowry-Methode

0,1 ml der Enzymlösung wurden mit 2 ml täglich frisch zubereitetem Lowry-Reagenz versetzt. Nach 10 min wurden 0,2 ml Folin-Ciocalteu's Phenolreagenz hinzugefügt und nach weiteren 30 min die Absorption am Eppendorf-Photometer bei 772 nm gegen einen Leerwert, der anstelle der Enzymlösung 0,1 ml 0,01 M NaPP pH 7,4 enthielt, gemessen. Aus Eichkurven mit Rinderalbumin als Referenzsubstanz ergab sich ein Proportionalitätsfaktor von 148.

2.2.3. Fütterung der Meerschweinchen und Behandlung mit Magensaftstimulantien

Die Meerschweinchen wurden nach Geschlechtern getrennt 24 - 48 Stunden vor dem Versuch (s. Tab. 5) nüchtern gesetzt. Wasser wurde ad libitum gegeben. Die Tiere wurden dann in eine Kontrollgruppe und 3 - 4 Versuchsgruppen geteilt, wobei auf eine gleichmäßige prozentuale Aufteilung der männlichen und weiblichen Tiere auf die einzelnen Gruppen geachtet wurde.

Der Versuchsgruppe der Serie 1 wurde für 2 Stunden, der Versuchsgruppe der Serie 2 für 3 Stunden Futter angeboten. Die Mägen aller Tiere waren bei der Präparation gefüllt.

Den Versuchsgruppen der Serien 3 - 10 wurde das jeweilige Pharmakon (s. Tab. 5) in bestimmten Dosen in Abhängigkeit vom Körpergewicht mit Hilfe einer Tuberkulinspritze in die Oberschenkelmuskulatur der Hinterbeine injiziert. Die Kontrollgruppen der Serien 3 - 10 erhielten entsprechende Volumina physiologischer Kochsalzlösung.

Nach dem Ablauf der Versuchszeit (s. Tab. 5) wurden die Tiere durch Genickschlag getötet und die Gewebeteile entnommen.

2.2.4. Statistische Auswertung

Zur Bestimmung von Mittelwerten und Standardabweichungen, die vielfach angegeben wurden, sowie zur Bestimmung der statistischen Signifikanz nach dem Student's t-Test und dem t-Test für gepaarte Daten (SNEDECOR & COCHRAN, 1967) wurde ein Tischcomputer (Programma 102, Olivetti, Ivrea) verwendet.

Versuchs- serien-Nr.	n	Verteilung männlich/ weiblich % / %	Stimulation der Magen- saftsekretion durch	Fütterung oder verwendete Dosen des Pharmakons	Versuchs- zeit [min]	Nüchtern- zeit [std]
1	19	50 / 50	Fütterung	ohne ⁺ / 2 Std	120	24
2	20	50 / 50	Fütterung	ohne ⁺ / 3 Std	180	48
3	39	50 / 50	Pentagastrin	0 ⁺ 10; 50; 100µg/kg	60	36
4	40	50 / 50	Pentagastrin	0 ⁺ 100µg/kg	15; 30; 60	48
5	40	50 / 50	Pentagastrin	0 ⁺ 100; 200; 500µg/kg	30	36
6	40	60 / 20	Pentagastrin	0 ⁺ 50; 100; 200; 500µg/kg	40	48
7	40	100/ 0	Caerulein	0 ⁺ 10; 40; 80µg/kg	30	36
8	40	100/ 0	Carbachol	0 ⁺ 5; 10; 50µg/kg	30	48
9	40	100/ 0	Insulin	0 ⁺ 0,5; 1,0; 5,0 IU/kg	30	36
10	40	100/ 0	2-Desoxy-D-Glukose	0 ⁺ 50; 200; 500mg/kg	30	36

Tab. 5 Versuchsbedingungen zur Fütterung von Meerschweinchen oder zu deren Behandlung mit Magensaftstimulantien

⁺Kontrollgruppen. Weitere Erklärungen s. Text unter 2.2.3.

3. Ergebnisse

3.1. Vorkommen und Verteilung der Histaminmethyltransferase in verschiedenen Meerschweinchenorganen

3.1.1. Magen-Darm-Kanal und andere Organe bunter Meerschweinchen (Institutsstamm)

Um die Bedeutung des Histaminabbaus im Magen des Meerschweinchens über die Methylierung am Imidazolring abschätzen zu können, wurde zunächst bei 4 Tieren eines bunten Institutsstamms eine Reihe von Organen dieser Spezies auf ihren Aktivitätsgehalt an HMT untersucht (Tab. 6 u. 7).

Im Vergleich zu anderen Geweben zeigten die Proben aus dem Magen-Darm-Kanal sehr hohe Werte (Tab. 6). Von oral nach aboral fand sich ein ständiger Anstieg der Enzymaktivität vom Ösophagus bis zum Jejunum, das die absolut höchste Enzymaktivität hatte. Diesem Anstieg folgte dann ein Abfall bis zum Colon, dessen HMT-Aktivität der des Ösophagus entsprach.

Trotz der geringen Versuchszahl von nur 4 Tieren (geschlechtsspezifische Unterschiede konnten ausgeschlossen werden, vgl. 3.1.2.) ergaben sich bei den meisten Übergängen von einem zum benachbarten Organbereich zum Teil sogar hoch signifikante Unterschiede, wobei allerdings diese Signifikanz zwischen Coecum und Colon auf die zufälligerweise geringe Streuung der entsprechenden Werte zurückzuführen sein dürfte.

Die annähernd gleichmäßige Verteilung der HMT-Aktivität über den gesamten Magen ergab sich nur bei den bunten Institutsstämmen, da Tiere eines weitgehend pathogenfreien Stammes im Antrumbereich des Magens signifikant erniedrigte Werte zeigten (s. 3.1.3.). Dies entspricht den beim Kaninchen gefundenen Verhältnissen (HERRMANN, 1977), während man bei Mensch, Hund und Schwein im Antrumbereich signifikant höhere Werte als im Fundus

Organbereich	Enzymaktivität [$\frac{\text{pmol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}}$]	Extremwerte	Signifikanz
Ösophagus	147,0 $\pm$ 54,3	100 - 194	p < 0,01
Magen-Fundus	297,3 $\pm$ 58,8	215 - 350	n.s.
Magen-Corpus	311,5 $\pm$ 90,0	187 - 383	n.s.
Magen-Antrum	309,2 $\pm$ 71,1	225 - 384	n.s.
Duodenum	305,5 $\pm$ 88,7	226 - 397	p < 0,05
Jejunum	474,7 $\pm$ 93,2	377 - 594	p < 0,01
Ileum	248,5 $\pm$ 77,9	138 - 321	p < 0,1
Coecum	167,5 $\pm$ 13,5	158 - 187	p < 0,05
Colon	142,2 $\pm$ 15,2	120 - 152	

Tab. 6 Verteilung der HMT-Aktivität im Magen-Darm-Kanal
des Meerschweinchens

Es wurden 2 männliche und 2 weibliche Tiere eines bunten Institutsstammes untersucht. Die Bestimmung der Enzymaktivität ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) erfolgte nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methodik. Signifikanzen wurden zwischen benachbarten Organbereichen (z.B. Magen-Antrum/Duodenum) nach dem t-Test für gepaarte Daten berechnet.

Organ oder Gewebe	n	Enzymaktivität	Extrem- oder Einzelwerte
		$\left[\frac{\text{pmol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}} \right]$	
Herz	4	94,5 $\pm$ 19,0	69 - 115
Lunge	4	103,0 $\pm$ 35,2	63 - 146
Niere	4	102,8 $\pm$ 18,6	82 - 127
Milz	4	380,2 $\pm$ 113,0	235 - 504
Leber	4	97,7 $\pm$ 76,6	50 - 186
Gl.submandibularis	4	109,0 $\pm$ 16,2	95 - 123
Gl.parotis	4	130,5 $\pm$ 38,7	97 - 164
Schilddrüse	4	50,5 $\pm$ 7,5	44 - 57
Nebenniere	4	31,5 $\pm$ 5,2	27 - 36
Ovar	2	178,5 $\pm$ 17,7	166 , 191
Uterus	2	156,0 $\pm$ 25,5	138 , 174
Hoden	2	124,5 $\pm$ 36,1	99 , 150
Samenblase	2	91,0 $\pm$ 11,3	83 , 99

Tab. 7 Verteilung der HMT-Aktivität in verschiedenen Organen des Meerschweinchens

Es wurden 2 männliche und 2 weibliche Tiere eines bunten Institutsstammes untersucht.

Die Bestimmung der Enzymaktivität ($\bar{x} \pm$ S.D.) erfolgte nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methodik.

und Corpus findet (BARTH, 1974).

Außer der Milz mit ihrer teilweise sehr hohen HMT-Aktivität zeigten alle anderen Organe wesentlich niedrigere Methylierungskapazitäten als die Organe des Magen-Darm-Bereichs (Tab. 7). Diese hohe Enzymaktivität im Darm und in der Milz entsprachen den beim Kaninchen (HERRMANN, 1977) und beim Menschen (BARTH, pers. Mitteilung) gefundenen HMT-Aktivitätsverteilungen, während beim Schwein die Methylierung des Histamins hauptsächlich in Magen, Nieren und Lunge erfolgt (BARTH, pers. Mitteilung).

Stellt man die Größe und das Gewicht der einzelnen Organe in Rechnung, wird aus dem Vergleich der Tab. 6 und 7 die Bedeutung der Methylierungskapazität des Magen-Darm-Trakts noch deutlicher.

3.1.2. Verschiedene Magenareale weißer und bunter Meerschweinchen (Institutsstämme)

Da im weiteren der Einfluß verschiedener Magensaft-stimulantien auf die HMT-Aktivität des Meerschweinchen-magens bestimmt werden sollte, wurde die Abhängigkeit der HMT-Aktivität in diesem Organ vom Geschlecht, Stamm und untersuchtem Magenareal bestimmt. Weiterhin sollte durch diese Untersuchungen der geeignetste Meerschweinchenstamm mit der geringsten biologischen Streuung der HMT-Werte ermittelt werden. Als Maß für diese Streuung wurde der Variationskoeffizient gewählt.

Wie schon unter 3.1.1. erwähnt, war bei den hier untersuchten Tieren die HMT-Aktivität in allen Magenarealen praktisch gleichmäßig hoch (Tab. 8); die etwas höhere Aktivität im Corpusbereich (113% der Aktivität des Fundus und 106% der des Antrums) ist von der anderer Magenabschnitte nicht signifikant verschieden. Auch ergaben sich bei Betrachtung nur eines Magenabschnittes weder

Stamm	weiß		bunt	
Geschlecht	männlich n = 5	weiblich n = 5	männlich n = 7	weiblich n = 7
Fundus	254,2 ± 53,6	235,6 ± 37,9	237,9 ± 82,6	256,6 ± 63,5
	244,9 ± 44,8		247,1 ± 71,5	
	246,2 ± 60,6			
Corpus	301,8 ± 73,6	268,6 ± 55,4	251,6 ± 77,8	291,1 ± 93,8
	285,2 ± 63,9		271,4 ± 85,3	
	277,1 ± 75,9			
Antrum	260,8 ± 79,4	215,4 ± 34,0	255,1 ± 62,5	296,7 ± 74,6
	238,1 ± 62,4		275,9 ± 69,6	
	260,2 ± 68,0			

Tab. 8 HMT-Aktivität im Fundus-, Corpus- und Antrumbereich des Magens von Meerschweinchen eines weißen und eines bunten Institutsstammes

Die Enzymaktivität (pmol/(min x mg Protein)) ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) wurde nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methodik bestimmt. Erfolgte eine Zusammenfassung der Werte nach dem Geschlecht, so ergaben sich für je 12 Tiere folgende Werte:

Fundus: männlich: 244,6 ± 69,6; weiblich: 247,8 ± 53,3;

Corpus: männlich: 272,5 ± 77,1; weiblich: 281,7 ± 77,8;

Antrum: männlich: 257,5 ± 66,6; weiblich: 262,8 ± 72,2;

Auf signifikante Unterschiede wurden folgende möglichen Kombinationen geprüft: 1. männlich/weiblich innerhalb eines Stammes (1a) sowie nach Mischung der Stämme (1b). 2. weiß/bunt innerhalb eines Geschlechts (2a) sowie nach Mischung der Geschlechter (2b). 3. Sämtliche Magenareale gegeneinander nach Mittelwertbildungen aus allen Tieren.

Unter Verwendung des Student's t-Tests bei Vergleichen innerhalb eines Magenareals und des t-Tests für gepaarte Daten bei solchen zwischen den einzelnen Magenabschnitten ergab sich in keinem Fall ein signifikanter Unterschied.

signifikante Unterschiede zwischen männlichen und weiblichen Tieren innerhalb desselben Stamms oder zwischen verschiedenen Institutsstämmen (weiß, bunt), noch zwischen diesen Stämmen, wenn man geschlechtlich gemischte Gruppen bildete (Tab. 8). Deshalb konnte im folgenden auf eine nach Geschlechtern getrennte Auswertung verzichtet werden; es wurde lediglich auf eine gleiche Geschlechtsverteilung innerhalb der Gruppen einer Versuchsserie geachtet (s. 2.2.3.). Der mittlere Variationskoeffizient lag bei den HMT-Bestimmungen im Magen der Tiere des weißen Institutsstamms mit $22,3 \pm 3,9 \%$ ($n=3$) etwas niedriger als der der bunten Tiere ($28,5 \pm 3,1 \%$; $n=3$). Der Unterschied war mit $p < 0,1$ an der Grenze der Signifikanz, die mit einer höheren Versuchszahl eventuell zu erreichen wäre. Der mittlere Variationskoeffizient aus allen HMT-Bestimmungsreihen in Meerschweinchenmägen der beiden Institutsstämme betrug $25,4 \pm 4,7 \%$ ($n=6$).

3.1.3. Magencorpus weitgehend pathogenfreier Meer- schweinchen (Pirbright-Stamm)

Wegen der eventuell zu erwartenden geringen Änderungen der HMT-Aktivität nach Stimulierung der Magensaftsekretion durch verschiedene exogene Stimulatoren war die oben beschriebene hohe Variation nicht tragbar. Unter Verwendung eines praktisch pathogenfreien Meerschweinchenstamms des Virus Research Institute, Pirbright, Großbritannien, war es möglich, den Variationskoeffizienten stark zu erniedrigen.

Eine Berechnung dieses Variationskoeffizienten für die HMT-Aktivitätswerte aus dem Corpusbereich der Kontrollgruppen der folgenden 10 Versuchsserien (Einzelwerte s. Tab. 9) ergab gegenüber dem für Institutsstämme erreichbaren Variationskoeffizienten (s. 3.1.2.) eine

hoch signifikante ($p < 0,001$) Verringerung auf $11,0 \pm 3,3 \%$ ($n=10$), wobei die in das Ergebnis eingehende Proteinbestimmung bereits mit einem Variationskoeffizienten von $11,3 \pm 4,2 \%$ behaftet war. Diese geringe biologische Streuung, die fast den Qualitätskriterien für klinisch-chemische Laborbestimmungen entsprach (BERGMEYER, 1970), ermöglichte überhaupt erst die Beurteilung der Frage, ob die HMT aus Meerschweinchenmagen durch Magensaftstimulantien beeinflusst werden kann. Bei den 9 Tieren der 1. Kontrollgruppe (22.1.73) wurden die HMT-Aktivitäts-Bestimmungen außer im Corpus- auch im Fundus - und Antrumareal durchgeführt (Werte s. Tab. 12). Dabei zeigte sich, daß diese Tiere im nicht säuresezernierenden Teil des Magens eine um 13% niedrigere ($p < 0,001$; t - Test für gepaarte Daten) Enzymaktivität aufwiesen und sich somit in der Enzymverteilung innerhalb des Magens wesentlich von den weißen und bunten Tieren der Institutsstämme unterschieden (vgl. 3.1.1.).

Versuchs- serien- Nr.	Datum	n	Proteinkonzentration im Inkubationsgemisch [mg / ml]	Variations- koeffizient [%]	Enzymaktivität ($\bar{x} \pm$ S.D.) $\left[\frac{\text{pmol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}} \right]$	Variations- Koeffizient [%]
1	22.1.73	10	15,3 $\pm$ 1,2	7,8	317,8 $\pm$ 35,3	11,1
2	19.2.73	10	18,4 $\pm$ 1,1	6,0	292,0 $\pm$ 21,1	7,2
3	23.2.76	9	15,6 $\pm$ 2,7	17,3	313,4 $\pm$ 25,8	8,2
4	5.3.73	10	20,5 $\pm$ 1,4	6,8	279,1 $\pm$ 36,4	15,0
5	16.3.73	10	19,0 $\pm$ 2,3	12,0	282,9 $\pm$ 19,2	6,8
6	23.5.73	8	20,2 $\pm$ 2,5	12,4	217,5 $\pm$ 21,4	9,8
7	6.6.73	10	20,5 $\pm$ 1,7	8,3	195,6 $\pm$ 23,9	12,2
8	27.6.73	10	21,9 $\pm$ 2,8	12,8	173,9 $\pm$ 17,3	9,9
9	19.7.73	10	18,9 $\pm$ 2,2	11,6	215,2 $\pm$ 29,6	13,7
10	27.8.73	10	19,6 $\pm$ 3,6	18,4	194,8 $\pm$ 32,5	16,6

Tab. 9 Histaminmethyltransferaseaktivität im Corpusbereich des Magens von Meerschweinchen
(Stamm Pirbright)

10 Kontrollgruppen der unter 3.5. beschriebenen Versuchsserien; Enzymaktivitäten ($\bar{x} \pm$ S.D.) und Proteinkonzentrationen ($\bar{x} \pm$ S.D.) wurden wie unter 2.2.1. und 2.2.2. beschrieben bestimmt. Mittlere Variationskoeffizienten für Enzymaktivitäten und Proteinkonzentrationen s. Text. Der hoch signifikante ($p < 0,001$, Student's t-Test) Unterschied zwischen den Mittelwerten der Serien 1-5 und der Serien 6-10 kann nur durch veränderte Haltung der Tiere durch den Züchter oder durch jahreszeitliche zyklische Schwankungen (2 monatige Pause von Serie 5 zu Serie 6!) erklärt werden.

3.2. Anreicherung der Histaminmethyltransferase aus der Corpusschleimhaut des Meerschweinchenmagens

Die höchste Anreicherung (112 fache) der HMT wurde bisher aus Schweineantrum mucosa erreicht (LORENZ et al. 1972, BARTH, 1974). Dabei handelt es sich wie bei dem Enzym aus Meerschweinchenhirn (BROWN et al. 1959) um ein lösliches Enzym, das nicht an zelluläre Partikel gebunden ist.

Auch aus dem Corpusanteil des Meerschweinchenmagens konnte durch Ultrazentrifugation ein lösliches Enzym gewonnen werden, das durch Chromatographie an DEAE-Cellulose angereichert wurde (s. 2.1.2.2.). Tab. 10 gibt die Ergebnisse für einen Anreicherungsang des Enzyms wieder, Abb. 2 ein Elutionsdiagramm von einer DEAE-Säule bei Elution mittels eines kontinuierlichen Kochsalzgradienten.

3.3. Eigenschaften der Histaminmethyltransferase aus der Corpusschleimhaut des Meerschweinchenmagens

3.3.1. Michaelis-Konstanten für Histamin

Die Michaeliskonstante für Histamin wurde graphisch durch Verwendung von Lineweaver-Burk-Diagrammen (LINEWEAVER & BURK, 1934) ermittelt. Die Ableitungen nach Eadie-Hofstee (HOFSTEE, 1952) ergaben hierzu keine signifikanten Unterschiede.

Sowohl mit dem einfachen, durch Ultrazentrifugation gewonnenen Enzympräparat als auch mit dem durch Ultrazentrifugation und Chromatographie an DEAE-Cellulose 6,2 fach angereicherten Präparat wurde durch Inkubation bei je 14 verschiedenen Histaminkonzentrationen ein K_m -Wert von $1,75 \times 10^{-5}$ ermittelt (Abb. 3).

Da der K_m -Wert für Histamin sich auf verschiedenen Stufen der Anreicherung nicht signifikant veränderte, war anzunehmen, daß die Werte zuverlässig waren und in allen Präparationen das gleiche Enzym vorgelegen hatte.

Behandlung	Protein [mg/ml]	Spezifische Aktivität $\left[\frac{\text{pmol}}{\text{min} \times \text{mg Protein}} \right]$	Anreicherung	Gesamt- aktivität [nmol/min]	Ausbeute %
Homogenisation	25,5	149	1	253	100
Ultrazentrifugation (60.000 g, 20 min; 143.000 g, 45 min)	5,10	375	2,5	249	98
DEAE-Cellulose- Chromatographie (NaCl-Gradient, pH 7,4)	2,15	920	6,2	111	44

Tab. 10 Anreicherung der HMT aus dem Corpusanteil des Meerschweinchenmagens

Einzelwerte von einem Enzympräparat, dessen Gewinnung unter 2.1.2.2. beschrieben wurde.

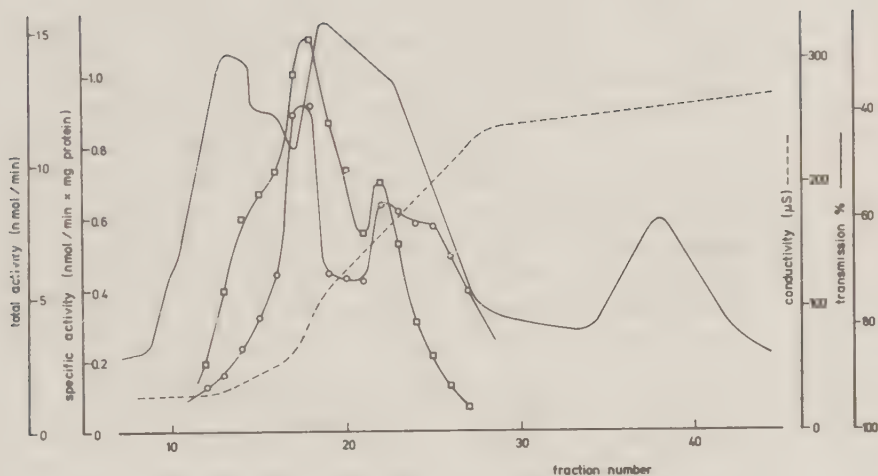


Abb. 2 Elutionsdiagramm für die Anreicherung der HMT an DEAE-Cellulose

- Spezifische Aktivität;
 □—□ Gesamtaktivität.

Elution mittels eines kontinuierlichen NaCl-Gradienten. Endkonzentration an Kochsalz 2,0 M. Elutionspuffer 0,01 M NaPP, pH 7,4.

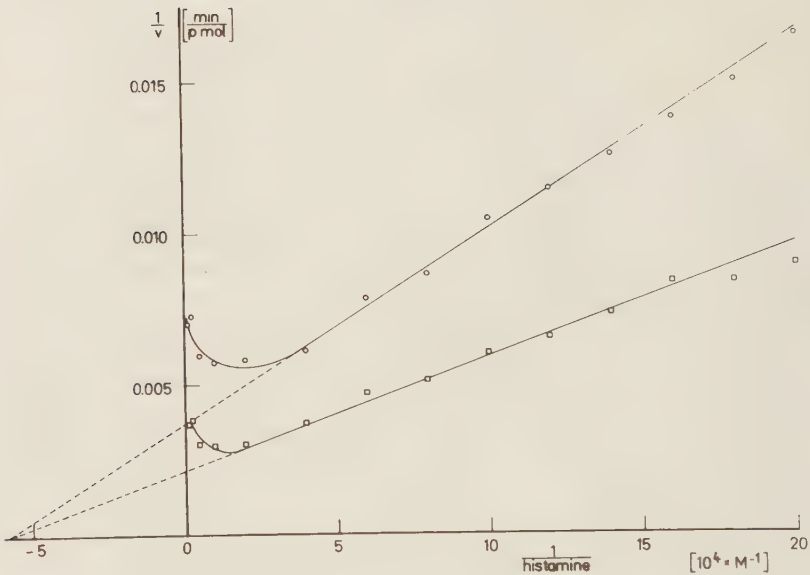


Abb. 3 Lineweaver-Burk-Diagramme der HMT-Aktivität bei verschiedenen Histamin-Konzentrationen

- einfache Enzympräparation durch Ultrazentrifugation (spez. Akt. 297 pmol/(min x mg Protein); 1035 µg Protein/Ansatz)
- angereichertes Enzympräparat (s. 2.1.2.2.) (spez. Akt. 791 pmol/(min x mg Protein); 235 µg Protein/Ansatz)

Die Regressionsgeraden wurden im Linearen Bereich nach der Gleichung $y = ax + b$ mit Hilfe eines Tischcomputers berechnet. Der Korrelationskoeffizient war in allen Fällen 0,98. Mittelwerte aus 2 Bestimmungen. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1. und Tab. 4.

3.3.2. pH-Optima

Die Bestimmung des pH-Optimums der Histaminmethyltransferase wird schon von Lindahl (LINDAHL, 1960) und Gustafsson und Forshell (GUSTAFSSON & FORSHELL, 1964) als schwierig beschrieben. Tab. 2 gibt die in der Literatur gefundenen Werte an, die zwischen pH 7,2 und 10,0 schwanken. In unseren Versuchen waren die Schwierigkeiten, ein eindeutiges pH-Optimum zu definieren, auf zwei Gründe zurückzuführen.

(1) Radioaktives SAM wird vom Hersteller in 0,01 M bis 0,001 M Schwefelsäure gelöst geliefert, da es bei neutralem oder leicht alkalischem pH relativ rasch zu 5'-Methylthioadenosin und Homoserin hydrolysiert wird (BADDILEY et al. 1953). (2) Höhere Konzentrationen verschiedener Puffer hemmen oder aktivieren die HMT in unterschiedlichem Ausmaß (BARTH, pers. Mitteilung).

Vor allem im alkalischen Bereich werden aber relativ hohe Pufferkonzentrationen benötigt, um die durch das radioaktive SAM eingebrachte Schwefelsäure abzupuffern.

Natriumdihydrogenphosphat-Dinatriumhydrogenphosphat-Puffer (0,05 und 0,10 M)

Keine Veränderung der Enzymaktivität im Vergleich zu Inkubationen mit 0,05 M NaPF, pH 7,4 (Standardinkubationsansatz s. 2.2.1.) wurde bei der Verwendung von 0,1 M Phosphatpuffer, pH 7,4 festgestellt. Der Kurvenverlauf, der die Änderung der Enzymaktivität in Abhängigkeit von 0,05 und 0,10 M NaPP, pH 7,4 (Abb. 4) zeigt, ergab eine Schulter zwischen pH 6,2 und 6,8. Bei pH 7,4 befand man sich in der relativ steil ansteigenden "sauren" Flanke des pH-Optimums. Im gesamten mit diesem Puffer bestrichenen Bereich bis 7,7 war kein eindeutiges Optimum festzustellen, obwohl zwei Meßwerte bei diesem pH-Wert niedriger als die einem pH

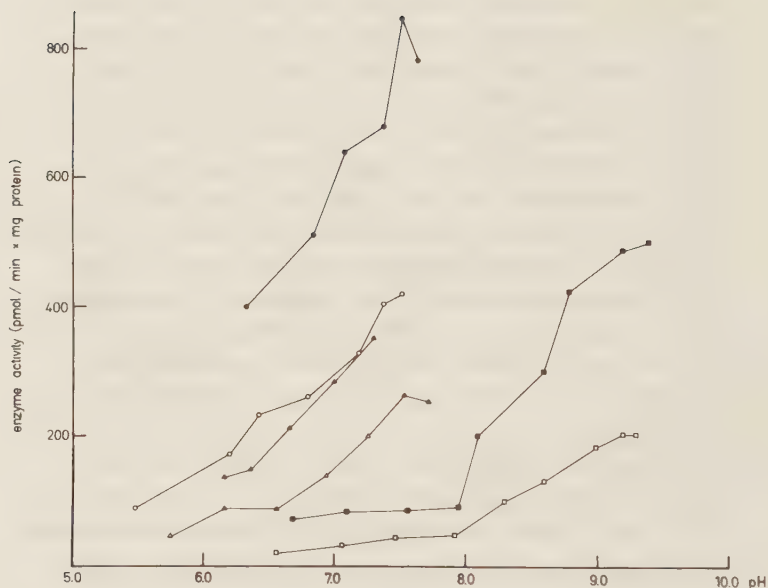


Abb. 4 Abhängigkeit der HMT-Aktivität aus dem Corpus-
anteil des Meerschweinchenmagens vom pH-Wert

Offene Symbole: Rohhomogenate gemäß 2.1.2.1. (Protein-
gehalt: 1,00 mg/ml); geschlossene Symbole: Angereicher-
tes Enzym gemäß 2.1.2.2. (Proteingehalt: 0,31 mg/ml).

○ - ○ bzw. ● - ● 0,05 M Phosphatpuffer

△ - △ bzw. ▲ - ▲ 0,10 M Phosphatpuffer

□ - □ bzw. ■ - ■ 0,20 M TRIS/32% HCl-Puffer.

Mittelwerte aus 2 bzw. 3 Bestimmungen. Alle Komponenten
des Inkubationsgemisches wurden in dem jeweiligen Puffer
gelöst und zugegeben. Einzelheiten der Enzymaktivitäts-
bestimmung s. 2.2.1.

von 7,5 entsprechenden Werte lagen.

Tris/32 % HCl-Puffer (0,2 M)

Während 0,1 M NaPP im Vergleich zum 0,05 M NaPP keine Änderung der HMT-Aktivität bewirkte, hemmte 0,2 M Tris/32 % HCl-Puffer das Enzym bei pH 7,4 um 85 % (15 % Restaktivität). Die bei diesem pH-Wert mit 0,05 M NaPP gemessenen Umsätze wurden mit diesem Tris-Puffer erst weit im alkalischen Bereich erreicht. Die höchsten Umsätze wurden bei pH 9,4 beobachtet, jedoch wurde dieses "Optimum" nicht der alkalischen Seite hin nach begrenzt.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß mit den beiden verwendeten Puffern die Frage nach dem gültigen pH-Optimum für eine in ihrer Aktivität nicht gehemmte HMT aus der Corpusregion des Meerschweinchenmagens nicht gelöst werden konnte. Während der Erstellung dieser Arbeit wurden als günstigste Puffergemische zur Bestimmung des pH-Optimums für das Enzym aus Schweinemagenmukosa Britton-Robinson-Puffer II und Teorell-Stenhagen-Puffer (Herstellung der Puffer s. STAUFF & JAENICKE, 1964) gefunden (BARTH, pers. Mitteilung).

3.4. In - vitro - Beeinflussung der Histaminmethyltransferase-Aktivität aus der Corpusschleimhaut des Meerschweinchenmagens durch Magensaftstimulantien

Da die unter 3.5. angeführten exogenen Magensaftstimulantien auf ihr Vermögen, die HMT in vivo zu beeinflussen, untersucht werden sollten, war es nötig, einen in-vitro-Effekt dieser Substanzen bei der Bestimmung der HMT-Aktivität auszuschließen. Dazu wurden die in Tab. 11 aufgeführten Substanzen nach den unter 2.2.1. beschriebenen Methoden untersucht. Die Zusammensetzung der Inkubationsgemische entsprach den in Tab. 4 angegebenen Konzentrationen.

Dabei lagen die in den Inkubationsansätzen verwendeten höchsten Substratkonzentrationen weit über denen, die einer gleichmäßigen Verteilung der applizierten Pharmaka im Gesamtorganismus entsprachen. Da jedoch die Möglichkeit einer Konzentrierung dieser Stoffe im Magengewebe durch aktive Prozesse oder durch Bindung an Rezeptoren nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden Carbachol in 3700 facher, Insulin in 1600 facher, Pentagastrin in 150 facher und Caerulein in 50 facher Konzentration (jeweils im Vergleich mit einer hypothetischen Gleichverteilung in allen Organkompartimenten) im Inkubationsansatz eingesetzt.

Keines der 4 untersuchten Magensaftstimulantien hatte einen Einfluß auf die HMT-Aktivität, da 7 Werte innerhalb der für in-vitro-Versuche unter Verwendung der angegebenen Methode geltenden S.D. von 5,0 % (BARTH, 1974) und weitere 4 Werte innerhalb von 2 S.D. (10 %) lagen. Lediglich ein Wert (11,4 %) überschritt die obere Toleranzgrenze geringfügig.

Endkonzentration des Pharmakons im Inkubations- ansatz	Prozentuale Enzymaktivität bei Zugabe von			
	Pentagastrin	Caerulein	Insulin	Carbachol
$1,0 \times 10^{-3}$ M	-	-	-	100
$1,0 \times 10^{-4}$ M	96	-	-	108
$0,6 \times 10^{-4}$ M	-	-	106	-
$1,0 \times 10^{-5}$ M	102	-	-	101
$0,6 \times 10^{-5}$ M	-	-	103	-
$0,3 \times 10^{-5}$ M	-	114	-	-
$1,0 \times 10^{-6}$ M	110	-	-	-
$0,6 \times 10^{-6}$ M	-	-	106	-
$0,3 \times 10^{-6}$ M	-	102	-	-
$0,3 \times 10^{-7}$ M	-	105	-	-

Tab. 11 Einfluß verschiedener Magensaftstimulantien auf die HMT aus dem Corpusanteil des Meerschweinchenmagens

Enzymaktivität ohne Zugabe der Pharmaka gleich 100%, Mittelwerte aus 4 Bestimmungen. Spezifische Aktivität 262 pmol/(min x mg Protein); 1,71 mg Protein/Ansatz. Weitere Einzelheiten zur Zusammensetzung der Inkubationsgemische s. 2.2.1. und Tab. 4.

3.5. Veränderungen der Histaminmethyltransferase-

Aktivität in der Corpusschleimhaut des Meerschwein- chenmagens nach Stimulation der Magensaftsekretion

3.5.1. Stimulation durch Fütterung

Nahrungsaufnahme ist der adäquate Reiz für die Sekretion von Magensaft (Magensäure und Aktivität). Daher wurde vor allen anderen exogen applizierten Stimulantien die Wirkung dieses "Stimulans" auf die HMT-Aktivität des Meerschweinchenmagens untersucht (Tab. 12).

Dabei verhielten sich der säuresezernierende Teil des Magens (Fundus, Corpus) und das keine Belegzellen tragende Antrum grundsätzlich verschieden. Während die Enzymaktivität im Fundus/Corpus-Bereich durch Nahrungsaufnahme in 2 Versuchsserien zwischen 15 % und 26 % ($p < 0,020$ in allen Fällen) zu steigern war, konnten im Antrum solche Einflüsse nicht beobachtet werden; die HMT-Aktivität dieses Magenteils blieb unverändert.

Faßt man die Einzelwerte für die Corpusbereiche der Serien 1 und 2 zusammen, so ergibt sich für die nüchterne Kontrollgruppe eine Aktivität von $305,6 \pm 31,2$ pmol/(min x mg Protein), für die gefütterten Tiere $354,3 \pm 56,4$ pmol/(min x mg Protein) (n jeweils 20), was eine hoch signifikante ($p < 0,005$) 16 % ige Zunahme der HMT-Aktivität in diesem Magenteil bedeutet.

Da die Ergebnisse für den Fundus- und Corpusbereich ähnlich waren, wurde in den folgenden Versuchsserien nur noch das Corpusresektat untersucht.

Versuchs- serien- Nr.	Magen- areal	HMT-Aktivität nüchterne	[$\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$] nach Nahrungs- aufnahme	Änderung in %	Signifikanz (Student's t-Test)
1	Fundus	$297,6 \pm 62,5$	$375,8 \pm 63,8$	+ 26	$p < 0,020$
	Corpus	$317,8 \pm 35,3$	$373,0 \pm 56,8$	+ 17	$p < 0,020$
	Antrum	$278,7 \pm 55,1$	$275,6 \pm 31,0$	- 1	n.s.
2	Corpus	$292,0 \pm 21,1$	$336,7 \pm 50,9$	+ 15	$p < 0,020$

Tab. 12 Steigerung der HMT-Aktivität des Meerschweinchenmagens durch Fütterung

Die Enzymaktivität ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) wurde nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methodik bestimmt, $n=10$ für alle Gruppen außer für Kontrollgruppe der Serie 1 (Corpus), wo $n=9$ war. Nüchternperiode vor Versuchsbeginn: Serie 1: 24 Std.; Serie 2: 48 Std.. Möglichkeit zur Nahrungsaufnahme: Serie 1: 2 Std.; Serie 2: 3 Std..

3.5.2. Stimulation durch Pentagastrin und Caerulein

Da Nahrungsaufnahme mit einer Freisetzung des intestinalen Hormons Gastrin aus dem Antrum einhergeht und da die hormonale Wirkung auf dem C-terminalen Tetrapeptid des Gastrinmoleküls beruht, wurden die synthetisch hergestellten Peptide Pentagastrin (5 Aminosäuren) und Caerulein (10 Aminosäuren), welche in ihren 4 C-terminalen Aminosäuren mit der Sequenz des Gastrins (Trp-Met-Asp-Phe-NH₂) identisch sind, auf ihren Einfluß auf die HMT-Aktivität des Meerschweinchenmagens untersucht (Tab. 13 u. 14).

Die Wirkung von Pentagastrin auf die Enzymaktivität aus dem Corpusbereich des Meerschweinchenmagens wurde in 4 Versuchsserien ausführlicher untersucht, da diese Substanz (1) das am häufigsten benutzte exogene Magensaftstimulans ist und (2) die mit diesem Stimulans gewonnenen Versuchsbedingungen auch bei der Untersuchung der anderen Magensaftstimulantien angewandt werden sollten.

Bei allen Versuchsserien steigerte Pentagastrin in einer Dosis von 10-500 µg/kg i.m. die HMT-Aktivität um 2-30% (Signifikanzschwellen s. Tab. 13). Bis zu einer Dosis von 100 µg/kg nahm die Steigerung der Enzymaktivität dosisabhängig zu (Versuchsserie 3), wobei die maximale Steigerung in einem zweiten Versuch (6) allerdings bereits durch 50 µg/kg erreicht wurde. Dosen über 100 µg/kg (bis 500 µg/kg) erbrachten keine weitere Erhöhung der Enzymaktivität.

Für eine starke Erhöhung der HMT-Aktivität erwies sich als günstigstes Zeitintervall zwischen Sekretstimulation und Tötung der Tiere ein Zeitraum von 30 min (Versuch 4), wobei allerdings auch schon nach 15 min eine hohe Steigerung festgestellt werden konnte. Die Schwierigkeit den Zeitpunkt optimaler Steigerung zu erfassen, zeigte sich

auch in der Tatsache, daß dieses Zeitintervall größten individuellen Schwankungen unterlag (große Streuungen um die Mittelwerte). Nach 60 min hingegen war die Zunahme der Enzymaktivität schon wieder deutlich geringer (13% gegen 30% in Versuch 4 und 18% gegen 30% in Versuch 3). Deshalb wurde das 30 minütige Versuchsintervall auch für alle kommenden Versuche beibehalten.

Auch bei Applikation von Caerulein in einer Dosis von 10-80 $\mu\text{g/kg}$ konnte eine Steigerung der Enzymaktivität gefunden werden, wobei das Maximum dieser Steigerbarkeit bei Verwendung von 40 $\mu\text{g/kg}$ lag (Tab. 14). Eine Steigerung über 30% hinaus konnte durch diese gastrin-ähnliche Substanz ebensowenig wie durch endogenes Gastrin (Nahrungsaufnahme) oder durch Pentagastrin erzielt werden.

Versuchs- serien-Nr.	Dosis [$\mu\text{g}/\text{kg}$]	Versuchs- zeit [min]	HMT-Aktivität [pmol/(min x mg protein)]	Änderung in %	Signifikanz (Student's t - Test)
			Kontrolle	behandelt	
3	10	60		319,5 $\pm$ 29,4	n.s.
	50	60	313,4 $\pm$ 25,8	354,2 $\pm$ 47,6	p < 0,050
	100	60		370,8 $\pm$ 38,8	p < 0,005
4	100	15		348,4 $\pm$ 53,1	p < 0,005
	100	30	279,1 $\pm$ 36,4	363,8 $\pm$ 62,3	p < 0,005
	100	60		316,4 $\pm$ 60,5	n.s.
5	100	30		311,0 $\pm$ 37,2	p < 0,050
	200	30	282,9 $\pm$ 19,2	306,5 $\pm$ 17,3	p < 0,020
	500	30		312,8 $\pm$ 38,9	p < 0,050
6	50	30		271,5 $\pm$ 21,4	p < 0,001
	100	30		241,5 $\pm$ 30,2	p < 0,100
	200	30	217,5 $\pm$ 21,4	239,5 $\pm$ 31,6	n.s.
	500	30		234,2 $\pm$ 14,3	p < 0,100

Tab. 13 Steigerung der HMT-Aktivität im Corpusanteil des Meerschweinchenmagens nach Applikation von Pentagastrin

Die Enzymaktivität ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) wurde nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methodik bestimmt. n=10 für alle Gruppen der Serien 3 - 5 und n=8 für alle Gruppen der Serie 6. Die Tiere waren vor Versuchsbeginn 36-48 std. nüchtern. Kontrolltiere erhielten 0,9% NaCl-Lösung (1-2 ml/kg). Applikationsform in allen Fällen i.m.

Dosis [$\mu\text{g/kg}$]	HMT-Aktivität ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) [$\text{pmol}/(\text{min} \times \text{mg protein})$]	Aktivitätszunahme in %	Signifikanz (Student's t-Test)
0 ^x	195,6 $\pm$ 23,9	-	-
10	217,3 $\pm$ 49,5	+ 10	n.s.
40	232,6 $\pm$ 40,5	+ 19	$p < 0,025$
80	227,4 $\pm$ 27,3	+ 16	$p < 0,020$

Tab. 14 Steigerung der HMT-Aktivität im Corpusanteil des Meerschweinchen-
magens nach Applikation von Caerulein.

Versuchsserie Nr. 7. n=10 für alle Gruppen. Versuchszeit 30 min.
Die Tiere waren vor Versuchsbeginn 36 std. nüchtern. Kontrolltiere
erhielten 0,9% NaCl-Lösung (4 ml/kg). Applikationsform in allen
Fällen i.m. Für weitere Einzelheiten zur Enzymbestimmung s. 2.2.1.
^xKontrollgruppe

3.5.3. Stimulation über cholinerge Mechanismen

Die Mechanismen, über welche Insulin und 2-Desoxy-D-Glukose die Magensaftsekretion stimulieren, sind noch weitgehend unbekannt (HIRSCHOWITZ & SACHS, 1965).

Carbachol wirkt als sogenannter stabiler Cholinester verlängert an Acetylcholinrezeptoren, da es für das Enzym Cholinesterase ein schlechtes Substrat ist.

Sämtliche Stimulationsversuche, die diese cholinergen Mechanismen beeinflussten, führten zu einer leicht erhöhten HMT-Aktivität im Magencorpus von Meerschweinchen (Tab. 15), wobei die maximal beobachtete Erhöhung 11% betrug. In keinem Fall war diese Steigerung signifikant, was auch nicht zu erwarten war, da sämtliche Aktivitätszunahmen innerhalb einer Standardabweichung der Methode ($VK = 11,3\%$) lagen (vgl. 3.1.3.). Somit vermögen im Gegensatz zu den über Gastrin oder gastrin-ähnliche Substanzen ablaufende Stimulierungen der Magensaftsekretion die cholinergen Mechanismen die Aktivität der HMT im Corpusbereich des Meerschweinchenmagens nur wenig oder nicht zu beeinflussen. Dies ist ein weiterer Hinweis (vgl. auch 4.4.) auf die Tatsache, daß die gastrinstimulierte Magensaftsekretion enger mit der Wirkung und dem Metabolismus von Histamin verknüpft ist als die durch Acetylcholin hervorgerufene Sekretion.

Versuchs- serien-Nr.	Magensaft- stimulans	Dosis	HMT-Aktivität Kontrolle	[$\mu\text{mol}/(\text{min} \times \text{mg Protein})$] behandelt	Änderung in %
8	Carbachol	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	173,9 $\pm$ 17,3	186,0 $\pm$ 26,2	+ 7
		10 $\mu\text{g}/\text{kg}$		189,2 $\pm$ 30,7	+ 8
		50 $\mu\text{g}/\text{kg}$		190,7 $\pm$ 32,8	+ 8
9	Insulin	0,5 I.U./kg	215,2 $\pm$ 29,6	228,9 $\pm$ 27,8	+ 6
		1,0 I.U./kg		231,2 $\pm$ 35,4	+ 7
		5,0 I.U./kg		221,7 $\pm$ 22,3	+ 3
10	2-Desoxy- D-Glukose	50 mg/kg	194,8 $\pm$ 32,5	193,4 $\pm$ 11,2	- 1
		200 mg/kg		215,6 $\pm$ 25,9	+11
		500 mg/kg		203,1 $\pm$ 36,5	+ 4

Tab. 15 Einfluß cholinergner Mechanismen auf die HMT-Aktivität im Corpusanteil des Meerschweinchenmagens

Die Enzymaktivität ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$) wurde nach der unter 2.2.1. beschriebenen Methodik bestimmt. n=10 für alle Gruppen. Versuchszeit 30 min. Die Tiere waren vor Versuchsbeginn 36 - 48 std. nüchtern. Kontrolltiere erhielten 0,9% NaCl-Lösung (1ml/kg für Serie 8 und 9, 2ml/kg für Serie 10). Applikationsform in allen Fällen i.m. Unter Verwendung des Student's t-Test ergibt sich zwischen keiner der behandelten Gruppen und der entsprechenden Kontrollgruppe ein signifikanter Unterschied.

4. Diskussion

4.1. Stellung der Histaminmethyltransferase im Histaminstoffwechsel der Magenschleimhaut

Histamin in der Magenschleimhaut ist " in a preferred position to histamine brought to or liberated in the mucosa of other portions of the gastro-intestinal tract. It will not be destroyed by diamine oxidase in the gastric mucosa, a most propitious and economical circumstance"⁺(CODE, 1956). Tatsächlich wurde keine oder nur sehr geringe Aminoxydase (Pyridoxalphosphat enthaltend)-Aktivität in der Magenschleimhaut des Menschen und anderer Säugetiere gefunden (WERLE, 1940; ROSE et al. 1940; DWORETZKY & CODE, 1951; HAEGER & KAHLSON, 1952; WATON, 1956; KOBAYASHI & IVY, 1958, 1959; KUSCHE et al. 1969; KIM et al. 1969):

Allerdings kann die Folgerung aus dieser Tatsache nicht mehr länger aufrecht erhalten werden, da hohe Aktivitäten von HMT in der Magenschleimhaut vieler Säugetiere (BROWN et al. 1959; LINDBERG, 1963; KIM et al. 1969; LORENZ et al. 1970, 1970a; AXELROD & VESELL, 1970; BARTH et al. 1972, 1975, 1976; TAYLOR, 1973) mit Ausnahme der Ratte (BROWN et al. 1959; KIM et al. 1969) gefunden wurden. Weiterhin wurden nach der Injektion von ¹⁴C-Histamin im Hund relativ große Mengen ¹⁴C-N^ε-Methylhistamin und ¹⁴C-N^ε-Methylimidazolessigsäure in der Magenschleimhaut gefunden (DOMERO et al. 1969). WHITE (1966) konnte relativ viel endogenes N^ε-Methylhistamin im Magen der Katze nachweisen. Deshalb ist die HMT sehr wahrscheinlich das Enzym, das nicht nur in vitro sondern auch in vivo das Histamin der Magenschleimhaut inaktiviert.

Die hohen Aktivitäten der HMT in der Fundus- und Corpus-schleimhaut passen zu der Hypothese, daß Histamin ein physiologischer Chemostimulator der Magensaftsekretion ist.

⁺"... in einer bevorzugten Position gegenüber dem Histamin, das zu anderen Teilen der Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes transportiert oder dort liberiert wird. Es wird nämlich in der Magenschleimhaut nicht durch Diaminoxydase abgebaut, ein äußerst vorteilhafter und ökonomischer Umstand."

Dies trifft vor allem bei der Katze und bei Nagern zu, bei denen immer der Magenanteil die höchste HMT-Aktivität enthielt, der auch die höchste Dichte an Parietalzellen aufwies (KIM et al. 1969), während bei Mensch, Schwein und Hund die höchste Aktivität im Antrum gefunden wurde (LORENZ et al. 1970; BARTH, 1974). Dies findet seine Erklärung vielleicht darin, daß Histamin nicht nur die exokrinen Drüsen stimuliert, sondern im Verdauungstrakt noch andere physiologische Funktionen hat, worauf von LORENZ et al. (1969, 1969 a) hingewiesen wurde. Relativ hohe Konzentrationen an Histamin (LORENZ & PFLEGER, 1968; LORENZ et al. 1969, 1969 a) und Histidindecaboxylase (LORENZ et al. 1969 b, 1969 c) konnten im Antrum des Menschen und vieler Säugetiere nachgewiesen werden, und somit könnte Histamin bei diesen Spezies in den Freisetzungsmechanismus des Gastrins eingeschaltet sein.

4.2. Reinigung der Histaminmethyltransferase aus

Meerschweinchenmorgengewebe

Die in dieser Arbeit erreichte Reinigung der HMT aus Meerschweinchenmagen, die maximal eine Anreicherung um das 6,2 fache erbrachte, kann sicherlich nicht befriedigen. Die bisher höchste erzielte Anreicherung einer HMT wurde aus Schweineantrummucosa durch Ultrazentrifugation, Ammoniumsulfat-Fällung, Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose und Gelchromatographie an Sephadex G100 erreicht (BARTH et al. 1972; LORENZ et al. 1972). Die hohen Verluste an Gesamtaktivität, die beim Vorgehen nach dieser Methode durch die Fällung mit Ammoniumsulfat auftraten, und der geringe Anreicherungsgrad in diesem Reinigungsschritt veranlaßten diese Autoren, die Ammoniumsulfatfällung aufzugeben (BARTH, 1974)

und unmittelbar an die Ultrazentrifugation eine Ionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Cellulose anzuschließen. Die so modifizierte Anreicherung erbrachte dann eine ca. 30fache Anreicherung mit hoher Ausbeute an Gesamtaktivität.

Diese vereinfachte Anreicherungsmethode ließ sich jedoch nicht auf das Enzym aus der Corpusschleimhaut des Meerschweinchens mit seiner anderen Proteinzusammensetzung übertragen, da bei Verwendung dieses Organs die Abtrennung von Fremdprotein durch das angewandte Ionenaustauschchromatographieverfahren zu gering war.

Die beschriebene Anreicherung des Enzyms stellt nach der Reinigung des Enzyms aus Schweineantrum mucosa (s. oben) die zweite Reinigung der HMT aus einem Magengewebe dar, dem für die Physiologie des Histamins bis heute wichtigsten Gewebe im Organismus. Aus anderen Organen, vor allem aus Gehirn und Leber, wurde das Enzym bereits von verschiedenen Autoren angereichert, doch fällt allgemein der schlechte Grad der Anreicherung auf. BROWN et al. (1959, 1959 a) erzielten nur eine 30fache Anreicherung des Enzyms aus Meerschweinchenhirn und nur eine 8fache aus Mäuseleber, LINDAHL (1960) eine 5 - 16fache Anreicherung aus Schweineleber, SNYDER et al. (1966) nur eine 6fache aus Meerschweinchenhirn, MERRIL et al. (1966) eine 7fache aus Meerschweinchenhirn und TAYLOR & SNYDER (1972 a) eine 6fache aus Mäusehirn. Da zudem die spezifische Aktivität der HMT im Magengewebe bereits im Rohhomogenat 5 - 10fach höher war als im Meerschweinchenhirn und in der Schweineleber, wies unser 6,2fach angereichertes Enzympräparat bereits dieselbe spezifische Aktivität auf, wie die Enzympräparate der anderen oben erwähnten Autoren.

4.5. Vergleich der enzymatischen Eigenschaften der HMT aus dem Meerschweinchenorgangewebe mit den Ergeb- nissen über die HMT aus anderen Organen

Ein Vergleich der K_m -Werte für Histamin zeigt nach Tab. 2 eine große Ähnlichkeit des Enzyms aus Meerschweinchenmagen ($K_m = 1,75 \times 10^{-5} M$) mit fast allen HMT-Präparationen aus anderen Organen. Lediglich die Enzyme aus Katzen- und Menschenleber zeigen mit K_m -Werten von $8,1 \times 10^{-5} M$ (AXELROD & VESELL, 1970) und $10 \times 10^{-5} M$ (LINDAHL, 1960) erheblich höhere Werte. Der letztere Wert konnte durch GUSTAFSSON & FORSHELL (1964) allerdings nicht bestätigt werden. In einem ganz anderen Konzentrationsbereich lag eines der von AXELROD & VESELL (1970) beschriebenen Isoenzyme der HMT, dessen K_m -Wert für Histamin $95 \times 10^{-5} M$ betrug.

Das pH-Optimum für die HMT aus Meerschweinchenmagen war aus den schon unter 3.3.2. genannten Gründen schlecht zu bestimmen. Es lag bei Verwendung von NaPP über pH 7,5 und von Tris/32 % HCl-Puffer über pH 9,4.

Auch andere Autoren berichten über Schwierigkeiten bei der Bestimmung des pH-Optimums. So vermerken GUSTAFSSON & FORSHELL (1964), daß bei Verwendung von 0,2 M Tris-Puffer das pH-Optimum für das Enzym aus Schweineleber zwar bei pH 8,8 lag, daß aber die Aktivitätskurve in Abhängigkeit vom pH-Wert aber nicht die "typische Glockenform" hatte und zwischen pH 7,0 und 8,0 (vgl. Ergebnisse dieser Arbeit in Abb. 4) ein Plateau zeigte, was auf eine Ionisierung des Substrates oder die Dissoziation essentieller SH-Gruppen zurückzuführen sein dürfte (GUSTAFSSON & FORSHELL, 1964). In der Arbeit von LINDAHL (1960) wird ein optimaler Reaktionsbereich für die HMT aus Schweineleber von pH 7-10 angegeben, der unter Verwendung von Phosphat-, Tris- und Glycinpuffer ermittelt wurde, wobei genauere Angaben über die Puffergemische fehlen. Unter Verwendung von NaPP findet

sich ein Plateau zwischen pH 6,0 und 7,0, mit Tris-Puffer eine Schulter zwischen pH 8,5 und 9,0 und mit Glycinpuffer ein pH-Optimum bei pH 10,0. Diese Werte stimmen nicht mit den von BARTH (pers. Mitteilung) für das Enzym aus Schweineantrum mucosa unter Verwendung der entsprechenden Puffer gefundenen Ergebnissen überein, wo das mit Tris-Puffer festgestellte Optimum mit 9,5 weiter im Alkalischen lag, als das mit Glycin festgestellte (pH 8,9). Die Unterschiede können einerseits damit erklärt werden, daß LINDAHL (1960) die gemessenen Aktivitäten gegen den pH des zugegebenen Puffers, nicht aber gegen den im Inkubationsmedium gemessenen pH aufgetragen hatte; andererseits wurde die durch den in hoher Konzentration eingesetzten Tris-Puffer (ca. 0,4 M) erzeugte Hemmung des Enzyms nicht berücksichtigt. BROWN et al. (1959) bestimmten das pH-Optimum für das Enzym aus Meerschweinchenhirn mit pH 7,2 - 7,4 unter Verwendung von 0,05 M NaPP. Sie schränken ihre Angaben insoweit ein, daß sie eine "relativ gute Aktivität" zwischen pH 6,5 und 8,0 feststellen konnten. Eine Differenzierung zwischen verschiedenen Methylasen auf Grund ihres pH-Optimums wie sie z.B. von SRINOOT & THITHAPANDHA (1972) durchgeführt wurde, dürfte ohne genauere Untersuchung des Einflusses der Puffer auf die Enzymaktivität nach den hier zusammengestellten Ergebnissen nicht durchführbar sein.

Aus den eigenen Versuchen und den hier erwähnten Literaturstellen läßt sich somit folgern, daß unter Verwendung von Tris/HCl-Puffer das Enzym bei neutralem pH-Wert gehemmt und mit diesem Puffer ein optimaler Umsatz erst weit im Alkalischen (pH 9,4) erreicht wird. Unter Verwendung von NaPP ergibt sich ein Bereich guter Enzymaktivität zwischen pH 7,4 und 8,4 für die meisten untersuchten Enzyme (vgl. Tab. 2), wobei lediglich das Enzym aus Schweineleber von LINDAHL (1960) eine Ausnahme darzustellen scheint.

Wegen der widersprüchlichen Angaben und Ergebnisse bezüglich des pH-Optimums der HMT aus allen untersuchten Organen wurde für die Standardinkubationsansätze (s. 2.2.1.) ein pH von 7,4 beibehalten.

4.4. Bedeutung der Steigerung der HMT-Aktivität durch Magensaftstimulationen

Die Säuresekretion aus den Belegzellen des Magens wird im wesentlichen durch drei Substanzgruppen stimuliert:

1. durch die verschiedenen (ca. 12) Gastrine, die Polypeptide verschiedener Kettenlänge mit dem C-terminalen Tetrapeptid Trp-Met-Asp-Phe-NH₂ darstellen;
2. durch Acetylcholin aus den Nervenendigungen des Nervus vagus und denen der autonomen Nervengeflechte; und
3. durch Histamin und seitenkettenmethylierte Histamine (CODE et al. 1971; LIN et al. 1962).

Über den Mechanismus dieser Stimulierung gibt es verschiedene Hypothesen, die seit ca. 50 Jahren heftig diskutiert werden und die nach neueren und neusten Befunden (s. 1.1.) alle ein bestimmtes Mass an Wahrscheinlichkeit beanspruchen dürfen. Eine Synthese dieser Vorstellungen stellt das in Abb. 5 dargestellte Modell dar.

Während nach diesem Modell eine Interaktion zwischen den verschiedenen Substanzgruppen nur über die Rezeptoren an der Belegzelle und über die Histaminfreisetzung aus den Mastzellen besteht, zeigt die Steigerbarkeit der HMT durch Gastrin und gastrinähnliche Stoffe, daß weitere Wechselwirkungen zumindest zwischen diesen Stimulantien bestehen. Allerdings konnte diese Steigerung von anderen Autoren (BERGMARK et al. 1976) nicht beobachtet werden, was auf methodische Unterschiede sowohl in der Wahl des Tiermaterials (s. 3.1.3.) und der Versuchsdauer (s. 3.5.2.)

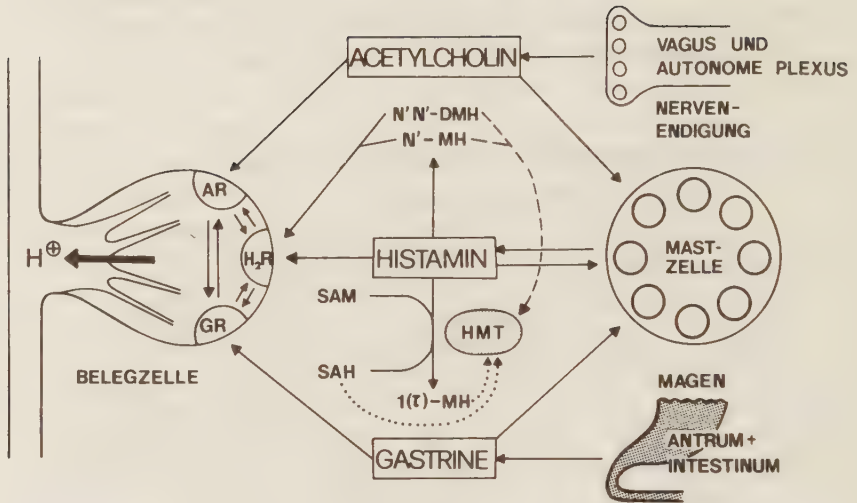


Abb. 5 Modell für das "stimulus-secretion-coupling" an der Belegzelle des Magens und für die Rolle von methylierten Histaminen und HMT in diesem System (nach BARTH, 1974)

(. ➔) Hemmung der HMT; (- - - - ➔) Aktivierung der HMT.

AR: Acetylcholinrezeptor; H_2R : Histamin- H_2 -Rezeptor; GR: Gastrinrezeptor; $1(\tau)MH$: N^1 -Methylhistamin; N^1 -MH: N^1 -Methylhistamin; N^1, N^1 -DMH: N^1, N^1 -Dimethylhistamin.

als auch in der verwendeten Bestimmungsmethode für die Enzymaktivität (s. 2.2.1.) begründet sein dürfte. Die Steigerbarkeit der HMT-Aktivität durch Gastrin kann sowohl die nach Applikation von H_2 -Rezeptor-Antagonisten beobachtete erhöhte Histaminmethylierung (SHEPHERD et al. 1974) als auch die Aktivitätserhöhung dieses Enzyms nach Vagotomie (BARTH et al. 1976) erklären. Da in beiden Fällen das therapeutische Ziel die Herabsetzung der Magensaftsekretion ist, kommt es durch Wegfall der Unterdrückung der antralen Gastrinfreisetzung zu erhöhten Gastrinspiegeln im Plasma, die nach den vorliegenden Ergebnissen eine Steigerung der HMT-Aktivität zur Folge haben könnten.

Die fehlende Beeinflussung der HMT-Aktivität durch cholinerge Magensaftstimulantien in Dosen (s. 3.5.3.), die in jedem Fall eine maximale Sekretion erzeugten, wurde auch von BERGMARK et al. (1976) festgestellt. Dieses Ergebnis stellt neben anderen Resultaten (vgl. SPANDAU, 1976) einen weiteren Hinweis auf die Gültigkeit der Hypothese von BLACK et al. (1972, 1973) dar, daß Acetylcholin oder acetylcholinartige Stoffe ohne Histaminfreisetzung direkt auf die Belegzelle wirken.

5. Zusammenfassung

Unter der Katalyse von HMT wird im säuresezernierenden Teil des Magens das stark magensaftstimulierende Histamin in N^ε-Methylhistamin abgebaut, welches selbst keine Steigerung der Magensaftsekretion bewirkt. Die Frage nach einer Beeinflußbarkeit dieses Metabolisierungs-
weges durch andere hormonale oder pharmakologische
Magensaftstimulantien sollte untersucht werden.

1. Mittels einer Isotopenmethode wurde das Vorkommen von HMT im Magen-Darm-Kanal sowie in verschiedenen weiteren Organen von drei Meerschweinchenstämmen untersucht. Bei allen Stämmen enthielt der Magen eine sehr hohe HMT-Aktivität, die bei Tieren eines weißen und eines bunten Institutsstammes gleichmäßig über alle Magenabschnitte verteilt war, während bei den weitgehend pathogenfreien Tieren des Pirbright-Stammes das Antrum eine signifikant geringere HMT-Aktivität aufwies. Die hohe biologische Streuung der HMT-Aktivität für die Tiere der Institutsstämme ($VK=25,4\% \pm 4,7\%$) konnte durch Verwendung des Pirbright-Stammes so weit erniedrigt werden, daß ein VK von $11,0\% \pm 3,3\%$ erreicht wurde. Dies machte das Erkennen von geringen Enzymaktivitätsveränderungen erst möglich. Eine höhere Methylierungskapazität als im Magen fand sich beim Meerschweinchen nur im Dünndarm und in der Milz.
2. Aus dem Corpusanteil des Meerschweinchenmagens wurde das Enzym durch Ultrazentrifugation und Ionenaustauschchromatographie an DEAE-Cellulose 6,2 fach angereichert. Durch die hohe Ausgangsaktivität wurde mit dieser Anreicherung die Enzympräparation mit der bisher höchsten spezifischen Aktivität aus einem Meerschweinchenorgan erhalten.

3. An Eigenschaften wurden K_m -Werte ($1,75 \times 10^{-5}$ M) und pH-Optima (abhängig von den verwendeten Puffern) für Enzympräparationen verschiedener Anreicherung untersucht. Da sich bei Verwendung unterschiedlich angereicherter HMT-Präparationen die Eigenschaften nicht veränderten, war anzunehmen, daß in allen Reinigungsstufen das gleiche Enzym vorgelegen hatte.
4. Die exogenen Magensaftstimulantien Pentagastrin ($1,0 \times 10^{-6}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ M Endkonzentration) Caerulein ($0,3 \times 10^{-7}$ - $0,3 \times 10^{-5}$) Insulin ($0,6 \times 10^{-6}$ - $0,6 \times 10^{-4}$ M) und Carbachol ($1,0 \times 10^{-5}$ - $1,0 \times 10^{-3}$ M) hatten in den untersuchten Konzentrationsbereichen keinen Einfluß auf die in vitro-Aktivität der HMT aus dem Meerschweinchenmagen.
5. Nach Fütterung (endogene Gastrin-Freisetzung!) oder exogener Applikation von gastrinähnlichen Peptiden (Pentagastrin und Caerulein) wurde eine dosisabhängige Erhöhung der HMT-Aktivität im Fundus- und Corpusbereich, nicht jedoch im Antrumbereich des Meerschweinchenmagens (Stamm Pirbright) beobachtet. Carbachol, Insulin und 2-Desoxy-D-Glucose dagegen konnten die Histaminmethylierung nicht beeinflussen.
6. Die Steigerbarkeit der HMT-Aktivität durch Gastrin und gastrinähnliche Peptide und der fehlende Einfluß von cholinergen Magensaft-Stimulantien sind ein weiterer Hinweis auf die Gültigkeit der Hypothese, daß Gastrin und seine Analoge über den finalen Chemostimulator Histamin, Acetylcholin oder acetylcholinartige Stoffe aber ohne Histaminfreisetzung direkt auf die Belegzelle wirken.

6. Literaturverzeichnis

- AMURE, B.O. & GINSBURG, M. (1964)
Effects of chlorpromazine and bromo lysergic acid diethylamide on gastric secretion of acid induced by histamine in rats.
Brit. J. Pharmacol. 22, 520 - 526
- AMURE, B.O. & GINSBURG, M. (1964a)
Inhibition of histamine catabolism and the action of gastrin in the rat.
Brit. J. Pharmacol. 23, 476 - 485
- AURES, D.; DAVIDSON, W.B. & HAKANSON, R. (1969)
Histidine decarboxylase in gastric mucosa of various mammals.
Europ. J. Pharmac. 8, 100 - 107
- AXELROD, J. & TOMCHICK, R. (1958)
Enzymic o-methylation of epinephrine and other catechols.
J. Biol. Chem. 233, 702 - 705
- AXELROD, J. & VESELL, E.S. (1970)
Heterogeneity of N⁻ and O-methyltransferases.
Mol. Pharmacol. 6, 78 - 84
- BADDILEY, J.; CANTONY, G.L. & JAMIESON, G.A. (1953)
Structural observations on "active methionine".
J. Chem. Soc. 1953, 2662 - 2664
- BARTH, H.; TROIDL, H.; GOECKE, K.; HERRMANN, K.; SEIDEL, W. & LORENZ, W. (1972)
Histamine methyltransferase (HMT) distribution, purification and inhibition in vitro and in vivo.
J. Pharmacol. (Paris) 3, 521

- BARTH, H.; LORENZ, W. & NIEMEYER, I. (1973)
Inhibition and activation of histamine methyltransferase by methylated histamines.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 354,
1021 - 1026
- BARTH, H.; NIEMEYER, I. & LORENZ, W. (1973a)
Studies on the mode of action of histamine H_1 - and H_2 -receptor antagonists on gastric histamine methyltransferase.
Agents Actions 3, 138 - 147
- BARTH, H. (1974)
Histaminmethyltransferase in der Magenschleimhaut des Menschen und verschiedener Säugetiere: Anreicherung, Eigenschaften, Wirkungsmechanismen und Beeinflussbarkeit durch Histamin-Rezeptorantagonisten. Ein Beitrag zur Diskussion des Histamins als einem physiologischen Chemostimulator der Magensaftsekretion. Dissertation, Universität München.
- BARTH, H.; NABER, K.; NIEMEYER, I.; BICHLER, K.H. & LORENZ, W. (1974)
Histamine Concentration and Histamine Methyltransferase Activity of Rabbit Kidney during experimental hydronephrosis.
Br. J. Surg. 61, 918
- BARTH, H.; NIEMEYER, I. & LORENZ, W. (1974a)
Speculations about the binding sites of S-Adenosyl-L-homocysteine and some of its synthetic analogues to histamine methyltransferase.
Agents Actions 4, 186 - 188

- BARTH, H.; LORENZ, W. & TROIDL, H. (1975)
Effect of amodiaquine on gastric histamine methyltransferase and on histamine stimulated gastric secretion.
Brit. J. Pharmacol. 55, 321 - 327
- BARTH, H.; NABER, K.; BARTEL, K.E.; NIEMEYER, I. & LORENZ, W. (1975a)
Induction of histamine methyltransferase during experimental hydronephrosis:
A mechanism of adaptation for histamine homeostasis in rabbit kidney.
Agents Actions 5, 442 - 443
- BARTH, H.; LORENZ, W. & NIEMEYER, I. (1975b)
Properties and reaction mechanism of gastric histamine methyltransferase.
Abstracts 6th Intern. Congr. Pharmacol.
Helsinki, 96
- BARTH, H.; TROIDL, H.; LORENZ, W.; ROHDE, H. & GLASS, R. (1976)
Histamine and peptic ulcer disease:
histamine methyltransferase activity in gastric mucosa of control subjects and duodenal ulcer patients before and after surgical treatment.
Agents Actions (im Druck)
- BAUDRY, M.; CHEST, F. & SCHWARTZ, J.-C. (1973)
Studies on S-adenosylhomocysteine inhibition of histamine transmethylation in brain.
J. Neurochem. 20, 13 - 21

- BERGMARK, J.; GRANERUS, G.; HENNINGSSON, S.;
LUNDELL, L. & ROSENGREN, E. (1976)
Histamine metabolism of the guinea-pig
gastric mucosa.
J. Physiol. 257, 419 - 431
- BERGMEYER, H.U. (1970)
Methoden der enzymatischen Analyse, Bd.I
Verlag Chemie, Weinheim, 346 - 347
- BLACK, J.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, G.J.;
GANELLIN, C.R. & PARSONS, E.M. (1972)
Definition and antagonism of histamine
H₂-receptors.
Nature 236, 385 - 390
- BLACK, J.W. (1973)
Speculation about the nature of the anta-
gonism between metiamide and pentagastrin.
In: "International Symposium on Histamine
H₂-Receptor Antagonists" (Herausgeber C.J.
Wood & M.A. Simkins) 219 - 221
Deltakos Ltd., London
- BLACK, J.W.; DUNCAN, W.A.M.; EMMET, J.C.; GANELLIN, C.R.;
PARSONS, E.M. & WYLLIE, J.H. (1973)
Metiamide- An orally active histamine
H₂-Receptor Antagonist.
Agents Actions 3, 133 - 137
- BRIMBLECOMBE, R.W.; DUNCAN, W.A.M.; DURANT, G.J.;
EMMET, J.C.; GANELLIN, C.R. &
PARSONS, M.E. (1975)
Cimetidine - A non thiourea H₂-receptor
antagonist.
J. Int. Med. Res. 3, 86 - 92

- BROWN, D.D.; AXELROD, J. & TOMCHICK, R. (1959)
The distribution and properties of a
histamine-methylating enzyme.
J. Biol. Chem. 234, 2948 - 2950
- BROWN, D.D.; AXELROD, J. & TOMCHICK, R. (1959a)
Enzymatic N-methylation of Histamine.
Nature 183, 680
- BUNCE, K.T. & LAKE, H.J. (1975)
The in vivo metabolism of (^{14}C)histamine during pentagastrin stimulated acid secretion in the cat.
J. Physiol. 252, 75 - 76
- CODE, C.F. (1956)
Histamine and gastric secretion.
In: "Ciba foundation symposium on histamine".
(Herausgeber G.E.W. Wolstenholme & C.M. O'Connor)
J. & A. Churchill, London, 189 - 219
- CODE, C.F.; MASŁIŃSKI, S.M.; MOSSINI, F. &
NAVERT, H. (1971)
Methylhistamines and gastric secretion.
J. Physiol. 217, 557 - 571
- COOKE, A.R. (1970)
Potentiation of acid output in man by a distention stimulus.
Gastroenterology 58, 633 - 637
- DENCKER, H.; KAHLSON, G.; KOCKUM, I.; NARDY, C. &
ROSENGREN, E. (1973)
Histamine metabolism in human gastric mucosa.
Clin. Sci. Mol. Med. 45, 225 - 231

DINBAR, A. & GROSSMAN, M. I. (1972)

Interaction of stimulations of acid
secretion in cat.

Gastroenterology 62, 242 - 246

DOMERO, R.; HUANG, M.; DITTBRENNER, M. &

RAPINS, H. (1969)

Metabolic pathway of histamine in canine
gastric mucosa in relation to acid secretion.

Amer. J. Physiol. 216, 988 - 994

DU VIGNEAUD, V.; RACHELE, J.R. & WHITE, A.M. (1956)

A crucial test of transmethylation in vivo
by intramolecular isotopic labelling.

J. Amer. Chem. Soc. 78, 5131 - 5132

DWORETZKY, M. & CODE, C.F. (1951)

Passage of histamine across the wall
of the small bowel of guinea-pigs.

Amer. J. Physiol. 160, 462 - 469

FEMPPEL, J.; MAŠLIŇSKY, S. & SEWING, K.-F. (1976)

Der Einfluß von Histamin- H_2 -Rezeptor-
Blockern auf die Biosynthese und den
Abbau von Histamin in der Magenschleimhaut.

Z. Gastroenterol. 14, 252

FIELDING, L.P.; CURWAIN, B.P.; RUSSELL, R.C.G. &

BLOOM, S. (1975)

Evidence for separate actions of an
adrenergic β_2 -stimulant and a histamin
 $e-H_2$ -blocker on the oxyntic and
gastrin cells.

Brit. J. Surg. 62, 157

GREGORY, R.A. (1958)

Gastric secretion responses after
portal venous ligation.

J. Physiol. 144, 123 - 137

GROSSMAN, M.I. (1967)

Neural and humoral stimulation of
gastric secretion of acid.

In: "Handbook of Physiology, sect. 6:

Alimentary canal" (Herausgeber C.F. Code),
Baltimore, Williams & Wilkins Co, 835 - 863

GROSSMAN, M.I. & KONTUREK, S.J. (1973)

Inhibition of acid secretion in dog by
metiamide, a histamine antagonist acting
on H_2 -receptors.

In: "International Symposium on Histamine
 H_2 -Receptor Antagonists" (Herausgeber C.J.
Wood und M.A. Simkins) Deltakos Ltd.
London, 297 - 312

GUSTAFSSON, A. & FORSHELL, G.P. (1964)

Studies on the enzymic methylation of
histamine.

Acta Chem. Scand. 18, 2069 - 2076

HAEGER, K. & KAHLSON, G. (1952)

Distribution of Histamine and Histaminase
in the Gastro-Intestinal Mucosa of fed
and starved Cats.

Acta Physiol. Scand. 25, 230 - 242

HÅKANSON, R. (1970)

New aspects of the formation and function
of histamine, 5-hydroxytryptamine and
dopamine in gastric mucosa.

Acta Physiol. Scand., Suppl. 340, 1 - 134

HÅKANSON, R. & LIEBERG, G. (1971)

Evidence against histamine as final
chemostimulator of gastric acid secretion.

Amer. J. Physiol. 221, 641 - 643

HERRMANN, K.R. (1977)

Histamingehalt und Histaminmethyltransferase in der Kaninchenniere nach Nierenarterien- oder Nierenvenenverschuß.
Dissertation, Universität Marburg

HIRSCHOWITZ, B.I. & SACHS, G. (1965)

Vagal gastric secretory stimulation by 2-desoxy-D-glucose.
Amer. J. Physiol. 209, 452 - 460

HOFSTEE, B.H.J. (1952)

On the evaluation of the constant V_m and K_m in Enzyme Reactions.
Science 116, 329 - 331

JOHNSON, L.R. & GROSSMAN, M.I. (1969)

Potentiation of gastric acid response in the dog.
Gastroenterology 56, 687 - 692

JOHNSON, L.R. (1971)

Control of gastric secretion: No room for histamine.
Gastroenterology 61, 106 - 108

KIM, K.S.; BACKUS, B.; HARRIS, H. & ROURKE, P. (1969)

Distribution of diamine oxidase and imidazole-N-methyltransferase along the gastrointestinal tract.
Comp. Biochem. Physiol. 31, 137 - 145

KOBAYASHI, Y. & IVY, A.C. (1958)

Histamine metabolizing activity of dog stomach and intestine.
Amer. J. Physiol. 195, 525 - 527

- KOBAYASHI, Y. & IVY, A.C. (1959)
Histamine metabolizing activity of the
stomach and intestine of the rat.
Amer. J. Physiol. 196, 835 - 836
- KONTUREK, S.J. & OLESICY, J. (1967)
Potentiation between pentapeptid
(ICI 50123) and histamine in the
stimulation of gastric secretion in man.
Gastroenterology 53, 912 - 917
- KUSCHE, J.; LORENZ, W.; HAHN, H. & WERLE, E. (1969)
Occurrence and properties of diamine
oxydase in salivary glands and gastric
mucosa of man and other mammals.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmakol.
264, 265 - 266
- LIN, T.M.; ALPHIN, R.S.; HENDERSON, F.G.;
BENSLEY, D.N. & CHEN, K.K. (1962)
The Role of Histamine in Gastric
Hydrochloric Acid Secretion
Ann. N.Y. Acad. Sci. 99, 30 - 44
- LINDAHL, K.M. (1960)
The histamine methylating enzyme system
in liver.
Acta Physiol. Scand. 49, 114 - 138
- LINDBERG, S.; LINDELL, S.E. & WERTLING, H. (1963)
Formation and inactivation of histamine
by human foetal tissues in vitro.
Acta Obstet. Gyn. Scand. 42, Suppl. 1, 49-58
- LINEWEAVER, H. & BURK, D. (1934)
The determination of Enzyme Dissociation
constants.
J. Amer. Chem. Soc. 56, 658 - 666

- LORENZ, W. & PFLEGER, K. (1968)
Stoffwechsel und physiologische Funktion
von Histamin im Magen.
Klin. Wschr. 46, 57 - 71
- LORENZ, W.; KUSCHE, J.; HAHN, H. & WERLE, E. (1968)
Activity of diamine oxydase urease and
histidine ammonia-lyase by enzymatic
assay of ammonia.
Z. Anal. Chem. 243, 259 - 263
- LORENZ, W.; SCHAUER, A.; HEITLAND, S.; MATELKA, E. &
WERLE, E. (1969)
Biochemical and histochemical studies on
histamine in the digestive tract:
Distribution in different chordates and
cellular stores in the dog.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.
264, 274
- LORENZ, W.; SCHAUER, A.; HEITLAND, S.; CALVOER, R. &
WERLE, E. (1969a)
Biochemical and histochemical studies on
the distribution of histamine in the dige-
stive tract of man, dog and other mammals.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.
265, 81 - 100
- LORENZ, W.; HALBACH, S.; FEIFEL, G.; HAENDLE, H. &
WERLE, E. (1969b)
Determination, location and properties of
the specific histidine decarboxylase in the
gastric mucosa of man and other mammals.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol.
264, 273

- LORENZ, W.; HALBACH, S.; GERANT, M. & WERLE, E. (1969c)
Specific histidine decarboxylase in the
gastric mucosa of man and other mammals.
Determination, location and property.
Biochem. Pharmacol. 18, 2625 - 2637
- LORENZ, W.; BARTH, H. & WERLE, E. (1970)
Histamine and histamine methyltransferase
in the gastric mucosa of man, pig, dog
and cow.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.
267, 421 - 432
- LORENZ, W.; BARTH, H.; FEIFEL, G. & WERLE, E. (1970a)
Histamine methyltransferase in salivary glands
and gastric mucosa of man, dog, pig and cow.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 266, 396
- LORENZ, W.; REIMANN, H.J.; BARTH, H.; KUSCHE, J.;
MEYER, R.; DOENICKE, A. & HUTZEL, M. (1972)
A sensitive und specific method for the deter-
mination of histamine in humane whole blood
and plasma.
Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 353, 911 - 920
- LORENZ, W.; MAROSKE, D.; REIMANN-HUHND, A.; SIHLBOM, H. &
KECK, P. (1973)
Histamine, methylated histamines and parasymp-
athetic stimulation of salivary secretion.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, R 44
- LORENZ, W.; BARTH, H.; KUSCHE, J.; TROIDL, H.; ROHDE, H.;
SCHMAL, A.; STENNER, W.; NUSIME, G.;
HÄFNER, G.; GLASS, R. & FRIEDRICH, A. (1975)
A critical view concerning metabolism and
physiological function of histamine in the
gastric mucosa.
In: "International Symposium on Gastrointestinal
hormones" (Herausgeber S. Konturek)
Raven Press, New York (im Druck)

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDALL, R.J.
(1951)

Protein measurement with the Folin Phenol
Reagent.

J. Biol. Chem. 193, 265 - 275

MALINSKI, S.; FEMPEL, J. & SEWING, K.-F. (1976)

The effect of histamine H₂-receptor blockade
on biosynthesis and degradation of histamine
in the gastric mucosa.

Acta hepato-gastroenterol. 23, 76 - 77

MERRIL, C.R.; SNYDER, S.H. & BRADLEY, D.F. (1966)

Inhibition of histamine methyltransferase
by serotonin and chlorpromazine derivatives;
electronic aspects.

Biophys. Acta 118, 316 - 324

MORONI, F.; FANZOZZI, R. & MANNAIONI, P.F. (1973)

The influence of burimamide on ¹⁴C-hista-
mine uptake and metabolism by guinea pig
atrium and mouse neoplastic mast cells
in vitro.

Agents Actions 3, 187 - 189

MUDD, S.H. & CANTONI, G.L. (1964)

Biological transmethylation, methyl-group
neogenesis and other "one-carbon" metabolic
reactions dependent upon tetrahydrofolic acid.
Comprehensive Biochemistry 15, 1 - 47

NETTER, K.J. & BODENSCHATZ, K. (1967)

Inhibition of histamine-N-methylation by
some antihistamines.

Biochem. Pharmac. 16, 1627 - 1631

O'LEARY, W.M. (1965)

Transmethylation in the biosynthesis of
cyclopropane fatty acids.

In: "Transmethylation and methionine biosyn-
thesis" (Herausgeber Sharpiro & Schlenk)

Chicago Press, Chicago and London, pp. 94 - 106

POPIELSKI, L. (1920)

β -Imidazolyläthylamin und die Organextrakte

I. Teil: β -Imidazoläthylamin als mächtiger
Erreger der Magendrösen.

II. Teil: Einfluß der Säuren auf die Magen-
sekretion erregende Wirkung der
Organextrakte.

Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 178, 214 - 259

REILLY, M.A. & SCHAYER, R.W. (1970)

In vivo studies on histamine catabolism and
its inhibition.

Brit. J. Pharmacol. 38, 478 - 489

REILLY, M.A. & SCHAYER, R.W. (1971)

Techniques for measuring histamine formation
in mice.

Brit. J. Pharmacol. 42, 375 - 382

REILLY, M.A. & SCHAYER, R.W. (1971a)

Further studies on histamine catabolism
in vivo.

Brit. J. Pharmacol. 43, 349 - 358

ROSE, B.; KARADY, S. & BROWNE, J.S.L. (1940)

The Histaminase content of the Tissues of the
Rat and the Effect of Histamine Pretreatment.

Amer. J. Physiol. 129, 219 - 225

SCHAYER, R.W. (1959)

Catabolism of physiological quantities
of histamine in vivo.

Physiol. Rev. 33, 116 - 126

SCHAYER, R.W. & REILLY, M.A. (1970)

In vivo formation and catabolism of
 ^{14}C -histamine in mouse brain.

J. Neurochem. 17, 1649 - 1655

SCHAYER, R.W. & REILLY, M.A. (1973)

Metabolism of ^{14}C -histamine in brain.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 187, 34 - 39

SCHAYER, R.W. & REILLY, M.A. (1974)

Histamine catabolism in Guinea-pigs,
rats and mice.

Eur. J. Pharmac. 25, 101 - 107

SCHLENK, F. (1965)

The chemistry of biological sulfonium
compounds.

In: "Fortschritte d. Chemie org. Naturstoffe"
(Herausgeber L. Zechmeister) Springer

Verlag, Wien 1965, 23, 61 - 112

SCHWARTZ, J.-C.; POLLARD, H.; BISCHOFF, S.; REHAULT, M.C.

& VERDIERRE-SAHUQUE, M. (1971)

Catabolism ^3H -histamine in rat brain after
intracisternal administration.

Eur. J. Pharmac. 16, 326 - 335

SHAPIRO, S.K. & SCHLENK, F. (1960)

The Biochemistry of Sulfonium compounds.

Advances in Enzymology 22, 237 - 280

- SHEPHERD, D.M.; THODLEIFSSON, B.; TURNBULL, M.J. & WORMSLEY, K.G. (1974)
Effect of metiamide on histamine metabolism in man.
Digestion 11, 307 - 310
- SNEDECOR, G.W. & COCHRAN, W.G. (1967)
Statistical methods; 6th edition Iowa State University Press, Ames, Iowa
- SNYDER, S.H. & AXELROD, J. (1965)
Sex differences and hormonal control of histamine methyltransferase activity.
Biochim. Biophys. Acta 11, 416 - 421
- SPANDAU, M. (1976)
Wirkung von Amodiachin, Chlorochin, Chlorpromazin und EMD 16-923 auf die carbachol- und pentagastrinstimulierte Magensäuresekretion des Menschen und des Hundes.
Dissertation, Universität Marburg
- STAUFF, J. & JAENICKE, R. (1964)
Physikalische Chemie der Lösungen
In: "Biochemisches Taschenbuch"
(Herausgeber H.M. Runen) Springer Verlag
Berlin/Göttingen/Heidelberg, 92 - 103
- SURIYACHAN, D. & THITHAPANDHA, A. (1972)
Distribution and heterogeneity of histamine N-methyltransferase.
Biochem. Biophys. Res. Comm.
48, 1199 - 1207
- TAYLOR, K.M. & SNYDER, S.H. (1972)
Histamine methyltransferase: Inhibition and potentiation by antihistamine.
Mol. Pharmacol. 8, 300 - 310

- TAYLOR, K.M. & SNYDER, S.H. (1972a)
Dynamics of the Regulation of Histamine
Levels in Mouse Brain
J. Neurochem. 19, 1343 - 1358
- TAYLOR, K.M. (1973)
Comparison of the antihistaminic effect
of burimamide and mepyramine and their
effect on the activity of histamine
methyltransferase.
Biochem. Pharmacol. 22, 2775 - 2776
- THITHAPANDHA, A. & COHN, V.H. (1970)
Purification and studies on the reaction
mechanism of guinea pig brain imidazole
N-methyltransferase.
Fed. Prod. 29, 684
- THITHAPANDHA, A. (1972)
Substrate specificity and heterogeneity
of N-methyltransferase.
Biochem. Biophys. Res. Comm. 47, 301 -308
- THITHAPANDHA, A. & SRINOOT, P. (1972)
Comparative inhibitory effects of
vitamins on methylating enzymes.
Comp. Gen. Pharmacol. 3, 139 - 144
- THJODLEIFSSON, B. & WORMSLEY, K.G. (1975)
Aspects of the effect of metiamide on
pentagastrin-stimulated and basal gastric
secretion of acid and pepsin in man.
Gut 16, 501 - 508

TROIDL, H.; LORENZ, W.; BARTH, H.; RHODE, H.; FEIFEL, G.;
SCHMAL, A.; GOECKE, K.; REIMANN-HUHD. A. &
SEIDEL, W. (1973)

Augmentation of pentagastrin stimulated
gastric secretion in the Heidenhain pouch
dog by amodiaquine: Inhibition of histamine
methyltransferase in vivo?
Agents Actions 3, 157 - 167

WATON, N.G. (1956)

Studies on mammalian histidine decarboxylase
Brit. J. Pharmacol. 11, 119 - 127

WATON, N.G. (1971)

Histamine and the parietal cell.
Amer. J. Digest. Dis. 16, 921 - 933

WEICHSELBAUM, T.E. (1946)

Protein determination by the biuret method.
Amer. J. Clin. Path. 10, 40 - 46

WERLE, E. (1940)

Zur Kenntnis der Histidindecaboxylase
und der Histaminase.
Biochem. Z. 304, 201 - 213

WHITE, T. (1961)

Inhibition of the methylation of histamine
in cat brain.
J. Physiol. 159, 191 - 197

WHITE, T. (1966)

Histamine and methylhistamine in cat
brain and other tissues.
Brit. J. Pharmacol. 26, 494 - 509

ZEIGER, R.S.; YURDIN, D.L. & COLTEN, H.R. (1976)

Cellular and subcellar localization of
the catabolic enzymes, histaminase and
histamine methyltransferase in human
leucocytes.

J. Allergy Clin. Immunol. 58, 172 - 179

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren Professoren und Dozenten:

Amon, Arndt, Ax, Aziz, Baltzer, Bartelmai, Bichler, Bode, Börngen, Bommer, Braasch, Brück, Buchholz, Daume, Dehnicke, Dimroth, Dieterich, Dittrich, Dölle, Dombrowski, Doss, Egbring, Eißner, Engelhardt, Eschenbach, Exner, Frank, Friederich, Ganz, Gerdes, Goebel, Golenhofen, Gottesbüren, Graul, Grundner, Habermehl, Hamelmann, Hamm, Hardewig, Havemann, Heene, Hennis, Hensel, Hering, Hess, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Jakob, Joseph, Kaffarnik, Kalbfleisch, Karlson, Klaus, Klein, Kleinsasser, Knauff, Koch, Koecke, Koransky, Kühnel, Kuni, Lange, Lauer, Latta, Lehmann, Linneweh, Lorenz, Ludwig, Lütcke, Mahr, Mannheim, Maroske, Martini, Massarat, Menge, Meyer-Bertenrath, Müller, Neurath, Nöth, Petry, Pohlen, Portig, Popp, Pots, Ranft, Reim, Richter, Rieken, Rodeck, Rohen, Schachtschabel, Schaumlöffel, Schiff, Schleyer, Schmid, Schmidt, Schmitz-Moormann, Schneider, Seidel, Seifart, Siegert, Sodomann, Solcher, Straub, Sturm, Thoenes, Uhlarik, Walcher, Wehrmeyer, Welge-Lüssen, Wendt, Wesemann, Willenbockel.

Meinem verehrten Doktorvater, Herrn Prof. Dr. W. Lorenz, danke ich für die Überlassung des Themas und eines Arbeitsplatzes in seiner Abteilung sowie für seine Unterstützung bei der Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. H. Barth für seine freundliche und umfassende Hilfestellung und seine wertvollen Anregungen bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Weiterhin danke ich allen Mitarbeitern der Abteilung für experimentelle Chirurgie und pathologische Biochemie, insbesondere Frau I. Niemeyer und den Herren Tierpflegern Peil und Brusius.

Lebenslauf

Am 6. Mai 1950 wurde ich in Kirchhain, Kreis Marburg/Lahn, geboren. Mein Vater, Heinrich Stenner, ist Kulturbau-techniker, meine Mutter, Marlene Stenner, geb. Kornmann, ist Hausfrau.

Von 1956 bis 1968 besuchte ich die Gesamtschule in Kirchhain, an der ich im Juni 1968 das Abitur auf dem naturwissenschaftlichen Zweig ablegte.

Im Wintersemester 1968/69 begann ich das Medizinstudium an der Philipps-Universität in Marburg und bestand im Juli 1975 das Staatsexamen.

Meine Medizinalassistentenzeit begann ich im Oktober 1975 an der Medizinischen Universitätsklinik Marburg (Direktor: Prof. Dr. Martini) und setzte sie an der Universitäts-Kinderklinik Marburg, der Orthopädischen Universitätsklinik Marburg (Direktor: Prof. Dr. Exner) und an der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Gießen in Lich (Chefarzt: Prof. Dr. Bikfalvi) fort.

Im Juli 1972 heiratete ich Angelika Franz.

city schnelldruck ohg, 87 Würzburg, Marcusstraße 10a